

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Departamento de Fisiología Vegetal**

**Facultad de Biología**

**Identificación de genes que participan en  
el desarrollo de la arquitectura radicular  
en *Arabidopsis thaliana***

**TESIS DOCTORAL**

**Mónica Lanza Lucio**

**Madrid, 2008**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Departamento de Fisiología Vegetal**

**Facultad de Biología**

**Identificación de genes que participan en el desarrollo de la arquitectura radicular  
en *Arabidopsis thaliana***

**TESIS DOCTORAL**

**Mónica Lanza Lucio**

**Madrid, 2008**

**Identificación de genes que participan en el desarrollo de la arquitectura radicular  
en *Arabidopsis thaliana***

Memoria presentada por

**Mónica Lanza Lucio**

para optar al grado de  
Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Universidad Autónoma de Madrid

Julio, 2008

El Doctorando

**Mónica Lanza Lucio**

Vº Bº del Director de Tesis

**Dr. Antonio Leyva Tejada**

Vº Bº de la tutora de Tesis

**Dra. Francisca Fernández del Campo**

## RECONOCIMIENTOS

Quisiera dar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han ayudado en la realización de este trabajo.

En primer lugar a mi director de tesis, el Dr. Antonio Leyva, por su excelente dirección, por la confianza y el apoyo que ha depositado en mí y por hacerme el trabajo más ameno.

A la Dra. Berenice García por su asesoramiento directo en los dos primeros años de tesis, por nuestros contactos posteriores y colaboración en nuestros experimentos. Sin ella todo habría sido mucho más difícil.

Al Dr. Javier Paz-Arés por sus opiniones y porqué siempre encuentra la luz para que el trabajo continúe.

A la Dra. Francisca Fernández, mi tutora de tesis, por su buen trabajo, además de su cariño, comprensión y ánimo.

A José Manuel Franco y Regla Bustos por sus sugerencias y consejos en mis experimentos.

A Ana Páez, Joaquín Iglesias, Juanjo Bernal, Isabel Mateos, Mabel Puga, Marisa López, Pablo Catarecha y Yolanda Leo por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A Phillip Ringli por suministrarme el vector 27pAA2.

A Frantisek Baluska por la línea PIN2-GFP.

A Ykä Helariutta por el mutante *wol*.

A Ana Caño y Pedro Luis Rodríguez por los mutantes de brasinoesteroides.

A Pretie Dahiya y Keith Roberts por los cortes histológicos de las raíces de los mutantes *raw*.

A Pilar Cubas por enseñarme a realizar inclusiones en parafina.

A Roberto Solano por prestarme su colección de marcadores moleculares y a Carlos Alonso por su ayuda en el diseño de dCAPS.

Al servicio de cartografiado molecular de mutantes del proyecto GEFA por su ayuda en el mapeo de los mutantes *raw*.

A Fernando Pinto, Carmen Ascaso y Sara Paniagua del servicio de microscopía electrónica del CCMA por permitirme tener las imágenes de criobarrido.

A Silvia Gutiérrez por su experiencia, paciencia y dedicación en el microscopio confocal.

A Inés Poveda por las fotografías de los mutantes.

A todo el personal del invernadero, cocinas, cultivos “in vitro” e informática del CNB, ya que sin su ayuda esto no habría sido posible.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología- CSIC y ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia dentro del proyecto BIO2001-1204 y con una beca FPI (BES-2002-0952).

## AGRADECIMIENTOS

Es difícil expresar con palabras lo que siento en estos momentos tan importantes. Quisiera agradecer a todas las personas que me han apoyado desde el principio en esta aventura sin caer en el riesgo de dejarme a alguien olvidado en el tintero. Si es así, espero que comprendan que no es sencillo hacer memoria y no le den demasiada importancia a este escrito que seguramente no refleje el lugar que ocupan en mi corazón, ya que me resulta complicado plasmar en un papel el cariño que siento.

En primer lugar quiero agradecer a mi “jefesito” y a mis compañeros y amigos del laboratorio 312: Antonio, Pablo, Ana y Yoli. Chicos: Muchas gracias por confiar en mí, mantener mi ilusión por ir a trabajar y estar siempre ahí. Sois los mejores compañeros que podría desear.

No quiero olvidarme tampoco de las compañeras del 312 que se fueron: Quiero darle las gracias a Bere por su paciencia, constancia y sabiduría y por enseñarme a moverme por el laboratorio cuando aún estaba perdida y a Lola por ser tan realista y sincera.

Agradezco también a mis compañeros de Bionostra con los que he compartido tantas horas de pipeteo. Muchas gracias a Juanjo, Miguel Ángel y Diana por hacerme tan ameno el trabajo y por nuestras largas horas de radio y “Fito”.

A Yara, Melina y Jose por ser tan encantadores.

A Carlos Alonso, Edu, Maite y Belén por el buen rollo del laboratorio durante los comienzos de mi aventura por el CNB y a Pilar Cubas, Mar, César, Marisa, Jose Antonio y demás compañeros que han pasado por el 312 por saber compartir tan bien el espacio y por su saber estar.

A todos los miembros del laboratorio 311: Javier, Vicente, Marisa I., Regla, Isabel, Gabriel, Jimena, M<sup>a</sup> Jesús, Mónica, Mabel y Regla, sin olvidarme de Francisco, Esperanza, Joaquín, Marisa L. y José Manuel. Gracias por apoyarme y orientarme en los experimentos y por hacerme sentir como un miembro más de vuestro grupo.

Al resto de personas del Departamento de Plantas del CNB por hacerme sentir como en una gran familia y ayudarme siempre que lo he necesitado.

A mis compañeros de los cursos de doctorado: Rubén, Kike, Edu, Diego, Javi y Javiera por esas “cañitas” de las tardes de los jueves.

A mis amigas y amigos del CNB: Os quiero.

A mi gente de siempre de Las Rozas Inma, Rocío, Juan Carlos, Sergio, Ana, Elena, Miguel, Tamara, Carlos y a la pequeña Adriana por crecer conmigo.

A Sara, Yessi y Popi por quererme tanto.

A Mayte y Javi por ser mis vecinos favoritos.

A Virginia, Edu y Celia por ser como son.

A Bea, Jose, Almu, Fonso, Jorge, Lourdes, Patricia, Carol y demás amigos de Liendo (no caben en este folio) por cuidarme tanto, preocuparse por mí y hacerme creer que no existe la distancia.

A Pilar, Luis y Patricia por ser mi nueva familia.

A la abuela Asun y el resto de mi familia política por acogerme tan bien y ser tan cariñosos conmigo.

Al abuelo Simeón, el abuelo Luis y la abuela María porque siempre están presentes.

A Pío, Amparito y demás familia Herrería por lo que significan.

A mis abuelos Tina y Tonio, a mis tíos Yoli, Maite y Maxi y a mis primos Gonzalo, Pablo, Menchu, Diego, Carlos, Cristina, Alvaro y a mi niña Elena por ser más que una familia y por estar todos tan unidos.

A mi tío Carlos y a mis abuelos Sarito y Juanjo: me hubiese gustado tanto que estuviéseis ahora aquí...

A mis padres Charo y Antonio y a mis hermanos Íñigo y Jorge por conocerme tan bien, ser tan comprensivos y porque os necesito.

A Guillermo porque no soy nada sin ti y a Gonzalo por hacerme tan feliz.

*A mi familia*  
*A Guillermo*  
*A Gonzalo*



## ABREVIATURAS

- **2,4D:** Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
- **ABA:** Hormona ácido abscísico
- **abi:** *aba insensitive*
- **ACT:** actina
- **ADN:** Ácido desoxirribunucleico
- **ahp:** *His-to-Asp phosphorelay*
- **alf:** *aberrant lateral root formation*
- **anr:** *Arabidopsis nitrate regulator*
- **apl:** *altered phloem development*
- **AR:** Arquitectura radicular
- **arg:** altered gravitropic response
- **Arg:** Arginina
- **ARN:** Ácido ribunucleico
- **ARP:** actin relatd protein
- **ARR:** auxin response regulator
- **asa:** *antranilato sintasa*
- **aux:** *auxin resistant*
- **AUX:** Hormona auxina
- **axr:** *auxin resistant*
- **BAC:** “Bacterial Artificial Chromosome”
- **bes:** *bri1-EMS-suppressor*
- **bim:** *binding to microtubules*
- **bri:** *brassinosteroid insensitive*
- **brl:** *bri1 like receptor*
- **BS:** Hormonas brasinoesteroides
- **BSA:** seroalbúmina bovina
- **bzr:** *brasinazol resistant*
- **CAPS:** “Codominant Cleaved Amplified Polymorphic Sequences”
- **CitD:** CitocalasinaD
- **Col:** Ecotipo Columbia
- **cop:** *constitutive photomorphogenic*
- **CPD:** 23- $\alpha$ -hydroxyliase for 6-oxo-cathasterone
- **CQ:** Hormona citoquinina
- **cre:** *cytokinin response*
- **Cvi:** Ecotipo Cape verdi islands
- **Cys:** Cisteína
- **der:** *deformed root hairs*
- **DTT:** ditionitritol
- **EBL:** 24-Epibrasinólido
- **EDTA:** Ácido etilendiamidinotetracético
- **eli:** *ectopic lignification*
- **elp:** *ectopic deposition of lignin in pith*
- **EMS:** metanosulfonato de etilo
- **enl:** *enhancer of irx1*
- **EtBr:** Bromuro de Etidio
- **GAS:** Hormonas giberelinas
- **gem:** *gemini pollen*
- **GFP:** “Green Fluorescent Protein”
- **GUS:**  $\beta$ -Glucuronidasa
- **har:** *hypernodulation aberrant root*
- **hfr:** *hypocotyl in far red*
- **hy5:** *long hypocotyl 5*
- **hyh:** *hy5 homolog*
- **IAA:** Ácido indolacético
- **irx:** *irregular xylem*
- **Kb:** kilobase
- **KDa:** kilodalton
- **laf:** *long after far red*
- **LatB:** LatrunculinaB
- **LB:** Medio de Luria-Bertani
- **Ler:** Ecotipo Landsberg erecta
- **lin:** *lateral root initiation*
- **MAL:** myocardin-related SRF coactivator
- **mM:** milimolar
- **MOPS:** Ácido 3-[N-morfolín] propane sulfónico
- **MS:** Medio de Murashige-Skoog
- **MSBN:** Medio MS bajo en nitrato
- **NAA:** Ácido naftilacético
- **nhp:** *non hydrotropic response*
- **NIT:** Nitrolasa
- **nM:** nanomolar
- **NPA:** Ácido N-1-naftiltalámico
- **NTR:** Nitrate transporter
- **PAL:** phenylalanine ammonia liase

- **PC:** procambium
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- ***pdr:*** *phosphate deficiency response*
- ***pgm:*** *phosphoglucomutase*
- ***phy:*** *phytochrom*
- ***pin:*** *pin-formed*
- **QTL:** Quantitative trait locus
- ***raw:*** *root as in wol*
- ***rcn:*** *roots curl in NPA*
- ***rhg:*** *root and hypocotyl gravitropism*
- **RNAi:** ARN de interferencia
- ***rot:*** *rotundifolia*
- **SDS:** dodecil sulfato sódico
- **SSC:** citrato salino Standard
- **SSLP:** “Simple Sequence Length polymorphism”
- ***sur:*** *superroot*
- **TAE:** TRIS acetato de sodio-EDTA
- **TCH:** Genes touch
- **TIBA:** Ácido 2,3,5 triyodobenzoico
- **TRIS:** N, N, N,-tris[hidroximetil]amina
- ***trp:*** *triptófano*
- **Uk-1:** Ecotipo Umkirch
- ***wag:***
- ***wol:*** *wooden leg*
- **Ws:** Ecotipo Wassilewskija
- ***wvc:*** *wavy and compressed root*
- **μM:** micromolar

## ÍNDICE

# ÍNDICE

|   | Página    |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN</b>  | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>                                       | <b>3</b>  |
| 1.- Importancia de la arquitectura radicular              | 4         |
| 2.- Tipos de arquitecturas radiculares                    | 7         |
| 3.- Dificultad de estudio de la arquitectura radicular    | 9         |
| 4.- Factores que controlan la arquitectura radicular      | 11        |
| 4.1.- Factores endógenos                                  | 12        |
| 4.1.1.- Control de la dominancia apical                   | 12        |
| 4.1.2.- Raíces laterales y adventicias                    | 18        |
| 4.2.- Factores exógenos                                   | 21        |
| 4.2.1.- Sensibilidad a la gravedad                        | 21        |
| 4.2.2.- Intensidad y calidad de la luz                    | 24        |
| 4.2.3.- Hidrotropismo                                     | 25        |
| 4.2.4.- Presencia de nutrientes                           | 27        |
| 4.2.5.- Interacciones con microorganismos del suelo       | 31        |
| 4.2.6.- Presencia de obstáculos                           | 33        |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>38</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>                               | <b>40</b> |
| 1.-MATERIAL BIOLÓGICO                                     | 41        |
| 1.1.- Plásmidos   | 41        |
| 1.2.- Estirpes bacterianas                                | 41        |
| 1.3.- Material vegetal                                    | 41        |
| 2.- TIPOS DE CULTIVOS                                     | 42        |
| 2.1.- Cultivo de estirpes bacterianas                     | 42        |
| 2.2.- Cultivo de plantas                                  | 42        |
| 2.2.1.- Cultivo “in vitro” de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 42        |
| 2.2.1.1.- Cultivo de callos                               | 43        |
| 2.2.2.- Cultivo en tierra de <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 43        |
| 3.- MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN                             | 44        |
| 3.1.- Transformación de <i>Escherichia coli</i>           | 44        |
| 3.2.- Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>  | 44        |

|  | Página |
|--|--------|
| 3.3.- Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 44     |
| 4.- TECNOLOGÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS   | 45     |
| 4.1.- Aislamiento y purificación de ADN  | 45     |
| 4.2.- Amplificación de fragmentos de ADN   | 46     |
| 4.3.- Técnicas electroforéticas  | 46     |
| 4.4.- Aislamiento y purificación de ARN de plantas   | 47     |
| 4.5.- Electroforesis de ARN: Ensayo tipo northern  | 47     |
| 5.- TECNOLOGÍA DE PROTEÍNAS  | 48     |
| 5.1.- Aislamiento y purificación de proteínas  | 48     |
| 5.2.- Electroforesis de proteínas y ensayo tipo western  | 48     |
| 6.- CLONACIÓN POSICIONAL DE LOS MUTANTES SELECCIONADOS EN LA COLECCIÓN DE LEHLE                          | 49     |
| 7.- COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN <i>wavy</i>   | 50     |
| 8.- ENSAYO HISTOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD B–GLUCURONIDASA (GUS)   | 50     |
| 9.- TÉCNICAS MICROSCÓPICAS   | 51     |
| 9.1.- Preparación de muestras para microscopía óptica  | 51     |
| 9.2.- Preparación de muestras para microscopía confocal  | 51     |
| 9.3.- Preparación de muestras para microscopía de criobarrido  | 51     |
| 10.- TRATAMIENTOS INFORMÁTICOS   | 52     |
| 11.- FOTOGRAFÍA  | 52     |
| RESULTADOS   | 53     |
| 1.- IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES ALTERADOS EN EL DESARROLLO Y DISPOSICIÓN FUNCIONAL DE RAÍCES (AR)         | 54     |
| 2.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE LOS MUTANTES   | 58     |
| 2.1.- Caracterización genética y fenotípica de los mutantes <i>raw2</i> y <i>raw3</i>                    | 58     |
| 2.1.1.- Estudio de la sensibilidad a las hormonas citoquininas de los mutantes <i>raw2</i> y <i>raw3</i> | 60     |
| 2.1.2.- Estudio del desarrollo del tejido vascular en los mutantes <i>raw2</i> y <i>raw3</i>             | 61     |
| 2.1.3.- Cartografiado genético de los mutantes <i>raw2</i> y <i>raw3</i>                                 | 64     |
| 2.2.- Caracterización genética y fenotípica del mutante <i>wavy</i>                                      | 69     |
| 2.2.1.- Fenotipo del mutante <i>wavy</i>   | 69     |
| 2.2.2.- Cartografiado genético de la mutación <i>wavy</i>  | 70     |
| 2.2.3.- Complementación del fenotipo <i>wavy</i>   | 72     |
| 2.2.4.- Papel del citosqueleto en procesos de torsión y/o choque   | 73     |

|   |            |
|---|------------|
|   | Página     |
| 2.2.5.- Papel de la ruta de señalización de brasinoesteroides en los procesos de torsión mediados por ACTINA2 | 79         |
| 2.2.6.- Búsqueda de mutantes supresores del fenotipo <i>actin2-2</i>  | 85         |
| <b>DISCUSIÓN</b>  | <b>87</b>  |
| <b>1.- ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL TEJIDO VASCULAR DE LOS MUTANTES <i>raw</i></b>                              | <b>88</b>  |
| <b>2.- IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA ACTINA2 EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS HORMONAS BRASINOESTEROIDES</b>    | <b>93</b>  |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | <b>103</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>106</b> |
| <b>ANEXO</b>  | <b>126</b> |
| <b>CURRICULUM VITAE</b>   | <b>127</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

|                 |           |                  |           |                  |           |                  |            |
|-----------------|-----------|------------------|-----------|------------------|-----------|------------------|------------|
|                 | Página    |                  | Página    |                  | Página    |                  | Página     |
| <b>Figura 1</b> | <b>8</b>  | <b>Figura 10</b> | <b>60</b> | <b>Figura 19</b> | <b>71</b> | <b>Figura 28</b> | <b>85</b>  |
| <b>Figura 2</b> | <b>10</b> | <b>Figura 11</b> | <b>62</b> | <b>Figura 20</b> | <b>72</b> | <b>Figura 29</b> | <b>86</b>  |
| <b>Figura 3</b> | <b>13</b> | <b>Figura 12</b> | <b>63</b> | <b>Figura 21</b> | <b>74</b> | <b>Figura 30</b> | <b>101</b> |
| <b>Figura 4</b> | <b>18</b> | <b>Figura 13</b> | <b>64</b> | <b>Figura 22</b> | <b>76</b> | <b>Tabla 1</b>   | <b>50</b>  |
| <b>Figura 5</b> | <b>54</b> | <b>Figura 14</b> | <b>65</b> | <b>Figura 23</b> | <b>78</b> | <b>Tabla 2</b>   | <b>55</b>  |
| <b>Figura 6</b> | <b>56</b> | <b>Figura 15</b> | <b>66</b> | <b>Figura 24</b> | <b>80</b> | <b>Tabla 3</b>   | <b>56</b>  |
| <b>Figura 7</b> | <b>57</b> | <b>Figura 16</b> | <b>67</b> | <b>Figura 25</b> | <b>81</b> |                  |            |
| <b>Figura 8</b> | <b>58</b> | <b>Figura 17</b> | <b>69</b> | <b>Figura 26</b> | <b>83</b> |                  |            |
| <b>Figura 9</b> | <b>59</b> | <b>Figura 18</b> | <b>70</b> | <b>Figura 27</b> | <b>84</b> |                  |            |

**RESUMEN**

## RESUMEN

El control de la arquitectura radicular de las plantas es determinante para la colonización y el aprovechamiento de los recursos del sustrato y es un factor muy importante en agronomía, pero los genes implicados en los procesos de desarrollo y disposición de las raíces aún se desconocen. La dominancia apical y los tropismos de las raíces son dos factores relevantes para el establecimiento de la arquitectura radicular. En este trabajo se han aislado tres mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectados en esos factores. Los primeros, *raw2* y *raw3*, están alterados en el control de la dominancia apical y presentan insensibilidad para las hormonas citoquininas (CQS) y alteraciones en el desarrollo de tejido vascular por lo que son una herramienta fundamental de estudio del papel de las CQS en el desarrollo vascular. Además, el mutante *raw3* puede ser relevante para el estudio de genes implicados en la producción de madera. El tercer mutante, denominado *wavy*, fenocopia las respuestas de choque y de adición de hormonas brasinoesteroides (BS) en la raíz de *Arabidopsis*. Sin embargo los experimentos realizados han servido para diferenciar ambos procesos de torsión y para implicar por primera vez a la proteína ACTINA2 en la ruta de señalización de BS.



## **INTRODUCCIÓN**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.- Importancia de la arquitectura radicular**

El término “arquitectura radicular” (AR) se refiere a la configuración espacial de las raíces en su conjunto. Es un concepto importante y aplicado en agricultura y hace referencia a la disposición espacial de las raíces laterales en torno a la raíz principal y a su manera de colonizar el sustrato. Es un término que engloba a la morfología y a la topología de las raíces, sin entrar en su interacción con el sustrato definiendo a las raíces según su forma y conexión entre los distintos ejes de la raíz (Lynch, 1995). De esta forma la AR se puede entender como un apartado más amplio que estudia la forma global con la que las raíces de una planta colonizan el sustrato y se expanden tridimensionalmente. Este concepto es distinto del de “distribución” que se refiere a la cantidad y ubicación de las raíces de una determinada planta en un ecosistema, estudiando la cantidad de especies que colonizan un hábitat (Lynch, 1995).

La raíz es el órgano encargado de dar soporte proporcionando capacidad de anclaje a la planta y por tanto de gran importancia en la capacidad de éstas para colonizar determinados tipos de suelo. Además la raíz es el lugar donde se establecen interacciones con microorganismos, siendo este factor esencial en suelos pobres donde la disponibilidad de nutrientes es limitada. En estas interacciones la planta le aporta al microorganismo una serie de nutrientes que necesita para vivir recibiendo a cambio otros que los microorganismos han movilizizado haciéndolos mas fácilmente asimilables para la planta. Las raíces son por tanto un sistema complejo de interacciones que alteran su disposición espacial. Sin embargo las plantas tienen un programa de desarrollo con un patrón de crecimiento predeterminado genéticamente. Este patrón o arquitectura juega por si mismo un papel esencial en la capacidad de las plantas para explotar eficientemente los recursos del suelo. Existen muchos estudios comparativos entre genotipos de raíces con una capacidad diferente para adaptarse a estados carenciales de nutrientes y agua que se han relacionado con ARs diferentes. (Bloom, 1985; Rundel, 1991; Nielsen, 1994). Por ejemplo se ha visto que plantas de judía que fueron seleccionadas por sus altos rendimientos en suelos pobres en fósforo presentan raíces muy ramificadas, con un gran número de inicios secundarios y terciarios y por tanto con una gran capacidad de colonización del primer horizonte del suelo donde el fósforo es más abundante (Lynch, 1993). Este hecho sugiere que las plantas a lo largo de la

evolución han seleccionado aquellas arquitecturas que mejor se adaptan a las condiciones del suelo (Lynch, 1995). La mayoría de las variedades de arroz resistentes a determinados fertilizantes tienen un sistema radicular más profundo y ramificado que las de las plantas sensibles. Asimismo, las variedades de *Arabidopsis* con las mayores tasas de eficiencia en la captación de fosfato también poseen las raíces más grandes (Narang y col., 2000). Sin embargo, a pesar de que el patrón predeterminado es importante en muchas ocasiones la capacidad de la planta para modificar ese patrón de desarrollo en respuesta a nutrientes y agua es también muy relevante. Así por ejemplo a comienzos del siglo XX se comprobó que las plantas del desierto varían sus sistemas radiculares en función de la disponibilidad de agua. De esta forma en las épocas de sequía las plantas desarrollan sistemas radiculares muy ramificados y en las estaciones lluviosas sus arquitecturas radiculares son menos arbustivas (Cannon, 1911). Los ecotipos de *Arabidopsis* que aumentan el tamaño de la raíz y de los pelos radiculares en respuesta a la carencia de fosfato sobreviven mejor en condiciones limitantes de este nutriente (Narang y col., 2000). Estas observaciones indican que la distribución espacial del sistema radicular es un carácter de importancia agronómica que determina la productividad de las cosechas en condiciones extremas.

En los países en vías de desarrollo, el control de la AR tiene especial relevancia agronómica puesto que el uso de fertilizantes es impensable debido al elevado coste que le supone al agricultor y por ello la mejora de la producción se basa en la capacidad de adaptación de las raíces al sustrato mediante la selección de sistemas radiculares más óptimos. Sin embargo, en los países desarrollados las variedades utilizadas en los cultivos extensivos basan sus altos rendimientos en la utilización indiscriminada de recursos hídricos y en el aporte masivo de fertilizantes. Ello se debe a que en mejora genética nunca se ha considerado la eficiencia en la captación de recursos del suelo como un carácter agronómico deseable, ya que el problema estaba solucionado mediante el aporte masivo de agua y fertilizantes. Es decir, desde siempre se ha tendido a adaptar el suelo a la planta y no al contrario. Este planteamiento es responsable de importantes efectos negativos para el medioambiente. Las aguas residuales que provienen de los riegos contienen cantidades ingentes de fertilizantes, especialmente nitratos, que provocan la eutrofización de las aguas y por tanto su contaminación irreversible (Sharpley, 1999). Asimismo, los recursos hídricos están sometidos anualmente a variaciones impredecibles a las que las variedades cultivadas son incapaces de adaptarse

y esto provoca grandes pérdidas en las cosechas. Por otro lado, las reservas de fertilizantes comenzarán a escasear en un futuro próximo ya que los nitratos se fabrican utilizando fuentes de energía no renovables y estudios geológicos recientes indican que las reservas de fosfato se agotarán en menos de 100 años (Runge-Metzger, 1995). Estas predicciones sugieren que la utilización de variedades con ARs más eficientes en la captación de recursos del suelo será determinante para el mantenimiento de la producción de alimentos en el mundo.

Por otro lado, la AR está adquiriendo especial relevancia para la industria farmacéutica. Hoy en día se considera que aún existe una amplia variedad de compuestos que secretan las raíces y que tienen un elevado potencial aplicado en biomedicina (Gleba y col., 1999). Por este motivo está surgiendo una nueva industria fitofarmacéutica que utiliza cultivos de raíces para obtener metabolitos secundarios de interés biotecnológico. En este tipo de procesos, la posibilidad de manipular la configuración del sistema radicular tendría un impacto directo en el rendimiento de los cultivos hidropónicos e incluso en la variabilidad de los compuestos secretados (Flores y col., 1999).

Una línea de estudio en la identificación de los mecanismos moleculares que controlan la AR es la variación fenotípica que ocurre en la naturaleza. Se sabe que especies muy relacionadas desarrollan ARs diferentes. Por el momento se desconocen los mecanismos implicados en la variación fenotípica natural en el desarrollo de los sistemas radiculares (Malamy, 2005). Se han identificado genes cuantitativos relacionados con biomasa, profundidad, capacidad de ramificación...etc (Kamoshita y col., 2002; Kamoshita y col., 2002; Zhang y col., 2003), pero es difícil integrar esos genes en el conjunto del desarrollo de la AR. Recientemente se ha encontrado un paralelismo directo entre la arquitectura de la parte aérea y del sistema radicular. El incremento de los niveles de proteína TEOSINTE BRANCHED1 que participa en la ramificación del tallo produce una disminución en el porte de la raíz. En *Arabidopsis* se ha identificado el primer QTL relacionado con la talla de la raíz en un ecotipo silvestre de raíz pequeña denominado Uk-1. El QTL identificado es un factor de transcripción nuevo llamado BREVIS RADIX (BRX) portador de un codon de parada en su secuencia nucleotídica en las plantas de este. Es un caso único en el que un solo gen tiene un efecto tan impresionante en el tamaño de la raíz. Este estudio indica que la selección natural de

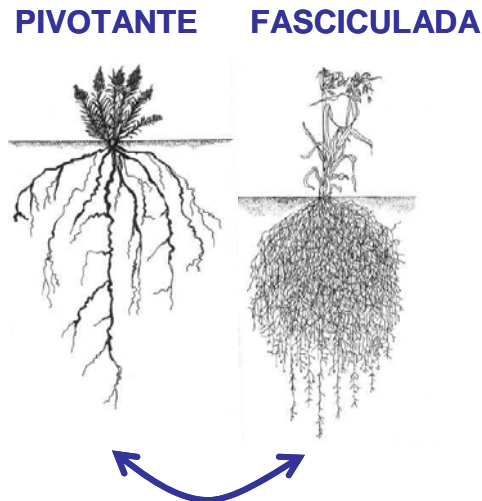
determinadas mutaciones ha tenido un papel esencial en la configuración de una determinada arquitectura que ha permitido la colonización de nichos específicos (Mouchel y col., 2004; Malamy, 2005).

## **2.- Tipos de arquitecturas radiculares**

Un sistema radicular se compone de una raíz principal, raíces laterales (primarias, secundarias etc) y raíces adventicias:

- La raíz principal es la primera que se desarrolla en la planta, configurada durante el desarrollo del embrión y es el punto de partida para el desarrollo de las raíces laterales y adventicias. Su función consiste en colonizar el suelo en profundidad y captar el agua y los nutrientes de los estratos mas profundos como el nitrato que tiende a lixiviar; es también el órgano mas importante para la supervivencia de la planta durante las primeras etapas del desarrollo de la misma, permitiendo la captación inmediata de agua y nutrientes y la correcta disposición de la plántula por su rápida respuesta gravitatoria y fototrópica.
- Las raíces laterales se originan más tarde y emergen a partir de la principal con un ángulo determinado genéticamente y su misión consiste en colonizar los primeros estratos del suelo en forma de onda expansiva para captar los nutrientes en especial fosfato. A partir de estas raíces laterales se pueden formar otras secundarias, terciarias etc, que amplían la superficie de absorción del sistema.
- Las raíces adventicias se desarrollan en una zona delimitada entre el inicio de la raíz principal y el tallo (la corona) y son las encargadas de aprovechar el agua y nutrientes en las capas más superficiales del sustrato siendo esenciales en la capacidad de anclaje de muchas especies.

Cada uno de estos órganos tiene por tanto un carácter funcional y por tanto arquitectónico. En general se distinguen dos tipos de arquitecturas radiculares: La raíz pivotante y la raíz fasciculada.



**Figura1. Representación de una arquitectura radicular pivotante y otra hiperfasciculada.**

Se denomina raíz pivotante a aquella en la que existe una raíz principal que adquiere una dominancia apical preponderante mientras las raíces laterales se disponen a ambos lados de la principal y con menor longitud. Este es el caso de *Arabidopsis thaliana*. Una raíz fasciculada se caracteriza por una pérdida de la dominancia apical de la raíz principal. En ella, las raíces laterales y adventicias se desarrollan igual que la principal y el resultado es un conjunto de raíces de aspecto arbustivo como ocurre por ejemplo en las plantas de judía de la variedad *Carioca* (Lynch, 1995) (Fig. 1). Pivotante y fasciculada son los tipos más importantes y más extremos de arquitectura entre los que se pueden englobar la mayoría de los sistemas. Por ejemplo se define una raíz tuberosa como aquella que posee un patrón pivotante, pero con la particularidad de que su raíz principal actúa como órgano de reserva y está engrosada. Sin embargo, una raíz tubero-fasciculada presenta un patrón fasciculado pero su raíz principal se diferencia del resto por su grosor. Además, existen otros tipos de raíces que actúan como órganos de reserva, como son el rizoma y el bulbo. En ambas, la raíz principal es más gruesa, pero en el caso del bulbo adquiere una forma de “pera” invertida y las raíces laterales se desarrollan en el extremo de la misma como si fuera un “pincel”. En un rizoma, por el contrario, la forma de la raíz principal es cilíndrica, aunque su disposición es perpendicular al eje de la gravedad y las raíces laterales se desarrollan solamente en una de las caras de la raíz principal repartiéndose por toda ella.

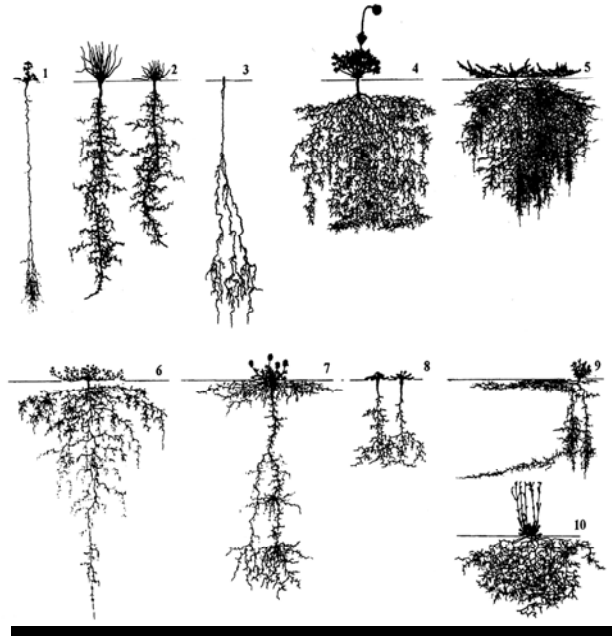
El hecho de que una planta haya optado por un patrón pivotante o fasciculado durante su evolución se basa en su adaptación a la disponibilidad de agua y nutrientes así como al tipo de suelo. Ambos tipos de raíz proporcionan ventajas adaptativas para su desarrollo en determinados ecosistemas. Una raíz pivotante es un sistema especializado en captar los nutrientes y el agua de los estratos más profundos del suelo al mismo tiempo que sus raíces laterales aprovechan los recursos de los estratos más superficiales. Estas raíces son importantes en suelos en los que el agua se pierde por lixiviación y a su paso arrastra los nutrientes vitales para la supervivencia de las plantas en especial el nitrato. Sin embargo este sistema es muy poco efectivo en suelos en los que los nutrientes se encuentran localizados en los primeros horizontes, como el fosfato y además proporciona muy poca capacidad de anclaje. Por el contrario un sistema fasciculado es más eficaz en la captación de nutrientes que se acumulan en los estratos más superficiales y junto con las raíces adventicias proporcionan una mayor capacidad de anclaje. Son sistemas muy eficaces en suelos poco profundos.

La configuración espacial que adoptan el conjunto de raíces laterales, adventicias y principal en el sustrato se ve alterada constantemente por las condiciones ambientales (Lynch, 1995). Estos factores son los responsables de que plantas de la misma especie vegetal adquieran configuraciones espaciales distintas según el ecosistema en el que se desarrollen, lo que da lugar a ARs diferentes y adaptadas a ambientes determinados (Lynch, 1995) (Fig. 2).

### **3.- Dificultad de estudio de la arquitectura radicular**

A pesar de la importancia de la AR, se conoce muy poco acerca de su disposición real en el sustrato y de los genes implicados en el control de la misma. Un sistema radicular es difícil de observar en tiempo real, de cuantificar e interpretar. Las raíces están constituidas por miles de ejes que varían en morfología, fisiología y desarrollo y es muy difícil establecer las herramientas analíticas cuantitativas capaces de modelizar eficazmente un sistema tan complejo que permita hacer predicciones (Nielsen y col., 1997). Sin embargo, las primeras estrategias de estudio de cuantificación de la AR se han basado en la geometría fractal. Esta teoría se centra en la consideración de unidades mínimas de estudio que se van repitiendo en un sistema un número indeterminado de veces. Así la raíz se considera la suma de repeticiones de unidades similares de

complejidad que se repiten en todas las direcciones y se ramifican para dar lugar a la AR definitiva de la planta (Nielsen y col., 1997).



**Figura 2. Ejemplos de las arquitecturas radicales entre diversas dicotiledóneas europeas, de Kutschera y Lichtenegger (1992).** 1, *Eryngium campestre*; 2, *Scorzonera villosa*; 3, *Chondrilla juncea*; 4, *Pulsatilla pratensis*; 5, *GGenista germanica*; 6, *Trigonella balansae*; 7, *Trifolium trichocephalum*; 8, *Carum caucasicum*; 9, *Onosma arenarium*; 10, *Silene otites*.

Durante la pasada década los avances en los estudios de AR se han centrado en desarrollar técnicas de imagen no invasivas. En este sentido se ha favorecido la evolución de la tomografía computacional. Esta herramienta de análisis permite efectuar medidas continuas en el tiempo a alta resolución mediante la monitorización de las raíces en 3D calculando a su vez el contenido de agua y material del suelo (Gregory y col., 2003; Van As, 2007). Esta tecnología aporta datos dinámicos, estructurales y funcionales de la disposición de las raíces en el sustrato y es un método de estudio apropiado para el análisis de las respuestas morfológicas de las raíces a la heterogeneidad del sustrato y además es un sistema que incluye las interacciones de la raíz con el sustrato (de Dorlodot y col., 2007). Sin embargo, una de las limitaciones principales de la tomografía para el estudio de la implicación de los genes en el desarrollo de la AR es el tiempo que se tarda en la adquisición de las imágenes (de una a varias horas en función del volumen de suelo y de la resolución). Estas limitaciones se salvan utilizando sistemas de imágenes en 2D tomadas por absorción de rayos X (Pierret y col., 2003) y transmisión de la luz (Garrigues y col., 2006).



En plantas herbáceas, como *Arabidopsis*, la visualización del sistema radicular es posible cuando se crecen las plantas en placas verticales con un sustrato con una dureza tal que impide la penetración de la raíz en el mismo. En estas condiciones se pueden visualizar y diferenciar ARs alteradas, lo que permite estudiar los genes implicados en esos procesos.

Por otra parte, durante el proceso de domesticación de las plantas se han producido cambios en la disposición espacial de sus raíces (Beebe y col., 2006; Chloupek y col., 2006; Kato y col., 2006; Sanguineti y col., 2006; Yue y col., 2006). La búsqueda de los QTLs responsables de estos cambios ha sido la vía de estudio de los genes responsables de esa variación genética. Hasta ahora las especies que más se han estudiado son *Oryza sativa* (arroz) y *Zea mays* (maíz), aunque existen otras 15 que incluyen *Arabidopsis* y tres especies de árboles. Asimismo, existen una serie de ejemplos que explican el 30% de la variación fenotípica, pero la mayoría de los cambios en la AR se deben a la adición de varios QTLs de efecto menor que interaccionan con el medio ambiente (de Dorlodot y col., 2007).

El estudio de los genes cuantitativos responsables de los cambios en la AR de las plantas y su seguimiento durante el tiempo mediante las técnicas de tomografía y rayos X son las herramientas básicas utilizadas en la actualidad para comprender la adquisición de la configuración espacial de la raíces en el sustrato.

#### **4.- Factores que controlan la arquitectura radicular**

La plasticidad de las raíces para generar una AR característica está influenciada por una serie de factores endógenos predeterminados genéticamente en la planta y otros factores exógenos establecidos por las condiciones ambientales que se manifiestan en el suelo en el que se produce el desarrollo de la raíz.

El genoma de una planta controla el patrón de desarrollo de la arquitectura de su raíz a través de varios factores endógenos: a) la dominancia de la raíz principal, b) la presencia de raíces secundarias, c) el número de inicios de raíces secundarias, d) la disposición de las mismas en cuanto a agrupamientos, distancia de internodos y ángulo

de crecimiento y e) la presencia de raíces adventicias, siendo la dominancia apical el factor preponderante.

Los factores exógenos varían en función del ambiente en el que se desarrolle la planta. Dentro de este grupo, podemos encontrar apartados tan importantes como: a) la sensibilidad a la gravedad, b) la intensidad y calidad de la luz, c) presencia de agua, d) presencia de nutrientes, e) interacciones con otros organismos (plantas, bacterias, hongos) y f) presencia de obstáculos físicos en el terreno. En este caso los factores más relevantes son la presencia de agua, nutrientes y obstáculos (Schiefelbein y Benfey, 1991).

Hasta hoy se han encontrado muy pocos genes implicados en el control de estos procesos debido a que el campo de estudio de la arquitectura radicular a nivel molecular es relativamente novedoso.

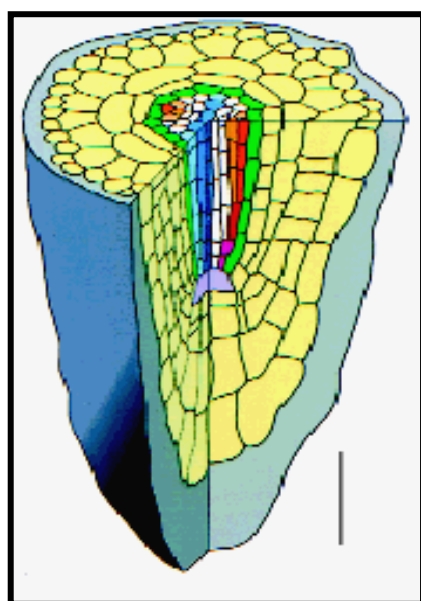
#### **4.1.- Factores endógenos.**

##### **4.1.1.- Control de la dominancia apical**

La dominancia apical es la capacidad que poseen las raíces de las plantas de colonizar el sustrato en profundidad y aumentar así la superficie de terreno que les permite la búsqueda de nutrientes y agua en los estratos mas profundos. En este campo se han descrito numerosos mutantes de *Arabidopsis* seleccionados por su pérdida de dominancia apical que se manifiesta fenotípicamente porque presentan un acortamiento de la raíz principal en comparación con las plantas silvestres. El control de la pérdida de dominancia apical es el factor más importante en el paso de una raíz pivotante a fasciculada, es decir, el acortamiento de la raíz principal favorece que las raíces laterales y adventicias aumenten su longitud permitiendo así el desarrollo de un fenotipo fasciculado.

Este factor se ha relacionado con la ruta de hormonas CQs y con el desarrollo del tejido vascular de las plantas. En el año 2000 Mähönen y col. identificaron un mutante de raíz corta al que denominaron *wol* (*Wooden Leg*) y que tiene alterado el patrón de desarrollo del tejido vascular ya que posee un número menor de células

iniciadoras (Mahonen y col., 2000). Durante la embriogénesis las células del procambium (PC) comienzan a dividirse de forma longitudinal y programada produciendo las células iniciadoras del tejido vascular. Éstas sufren una serie de divisiones transversales dando lugar a las células del protoxilema y protofloema que posteriormente maduran hasta adquirir la composición definitiva de las células del xilema y floema. En el mutante *wol* el número de divisiones está alterado y como resultado aparecen menos células iniciadoras que al final del desarrollo permanecen en estadio de protoxilema y son incapaces de desarrollar floema (Mahonen y col., 2000). En el año 2001 en una búsqueda de mutantes insensibles a citoquininas generando callos de hipocotilos, se seleccionó un mutante y tras realizar su clonaje posicional se descubrió que el gen era un alelo mutante de *wol* (Hwang y Sheen, 2001) y por tanto que esta proteína se trataba del receptor de CQs, al que se denominó CRE1 (*Cytokinin response 1*) (Inoue y col., 2001). De esta forma se destacó la importancia de las hormonas CQs en el desarrollo del tejido vascular y su papel en la conformación del sistema radicular de *Arabidopsis*. El mutante *wol* ha permitido abrir una nueva vía de estudio basada en la regulación de las CQs en la ruta de vascularización en plantas y desde su descubrimiento se han ido seleccionando mutantes alterados en la dominancia apical e insensibles a CQs que presentan defectos en el desarrollo de los haces vasculares (Ye, 2002; Ye y col., 2002; de Leon y col., 2004).



**Figura 3. Esquema del desarrollo de tejido vascular en *Arabidopsis*.**

El desarrollo vascular primario de la raíz de *Arabidopsis* implica a un eje xilemático y dos polos floemáticos.

|  |                     |  |                                |
|--|---------------------|--|--------------------------------|
|  | Protoxilema         |  | Células acompañantes           |
|  | Metaxilema          |  | Células del Procambium         |
|  | Protofloema         |  | Periciclo                      |
|  | Metafloema          |  | Centro quiescente              |
|  | Floema/Procambium   |  | Líneas celulares corticales    |
|  | Células Iniciadoras |  | Caperuza periférica de la raíz |

Las CQs controlan procesos de división y diferenciación celular (Skoog y Miller, 1957). En el laboratorio identificamos un nuevo alelo de *wol*, al que se le denominó *raw1* (*root as in wol 1*) y que muestra la particularidad de que en la F1 de un doble mutante *wol/raw1* se recupera la deficiencia de células iniciadoras para el desarrollo de tejido vascular, mientras que se mantiene la insensibilidad a CQs. Estos resultados demuestran que la proliferación de células del PC y la sensibilidad a CQs actúan por rutas al menos parcialmente independientes. (de Leon y col., 2004).

Durante la embriogénesis, es necesaria la correcta formación de las células del PC para que se puedan desarrollar correctamente las células del protoxilema y del protofloema, 2 ó 3 días después de la germinación (Dolan y col., 1993) (Fig. 3). La proliferación y diferenciación de estas células iniciadoras durante el desarrollo de la raíz principal es el primer punto de flexibilidad, ya que tienen que alternar entre la elongación de la raíz principal y el número y distribución de raíces laterales (Oyama y col., 1997; Baima y col., 2001). Hasta ahora, la mayoría de mutantes alterados en el desarrollo de tejido vascular afectan a estadios tardíos (Ye y col., 2002), aunque existen algunos, como *wol* y *raw1*, que afectan al número de células iniciadoras. La caracterización de éstos ha implicado a las hormonas CQs en la formación de las células iniciadoras del tejido vascular. A pesar de ello, aún queda mucho camino por recorrer para conocer los mecanismos implicados en las divisiones de células del PC y su capacidad para especializarse en células de xilema o floema. Todas estas observaciones nos indican que el control de la dominancia apical es un factor esencial en la disposición espacial de las raíces y que además puede ser controlado por pequeñas alteraciones en el desarrollo embrionario sin afectar a la capacidad de generar raíces laterales y adventicias las cuales son perfectamente funcionales como se observa en los mutantes *wol* y *raw1*. Por tanto, la caracterización de mutantes de raíz corta es sin duda un método factible para la identificación no solo de genes relevantes de la ruta de señalización de las hormonas CQs relacionadas con el control de la dominancia apical, sino también con el desarrollo y diferenciación del tejido vascular.

En el año 2003 se identificó el mutante *apl* (*altered phloem development*) que codifica un factor de transcripción tipo MYB que se requiere para la especificación del floema. Este mutante no desarrolla floema y en su lugar aparecen células lignificadas características del xilema (Bonke y col., 2003). El estudio del gen *APL* cobra gran

importancia en agronomía en el proceso de vascularización secundaria y engrosamiento de la pared celular. Por otro lado, se sabe que las CQs juegan un importante papel en la represión de la formación del xilema a nivel del PC (Mahonen y col., 2000). El grupo de Mahönen descubrió el gen *AHP6* (*HIS-TO-ASP PHOPHORELAY6*) en el año 2006 (Mahonen y col., 2006). La función de este gen es contraria a la de las hormonas CQs y favorece la formación del xilema, por lo que puede ser un candidato relevante para ser estudiado a fondo por sus aplicaciones en la industria maderera. Esta línea ha sido muy difícil de estudiar ya que el crecimiento de las especies leñosas es lento y se requiere mucho tiempo para obtener resultados. Actualmente, el estudio de los genes implicados en la producción de madera se ha centrado en teorías evolutivas basadas en la conservación de genes entre plantas herbáceas y leñosas, puesto que las primeras se han desarrollado desde las leñosas y por ello conservan los genes encargados de formar madera (Groover, 2005). Por otra parte existen multitud de artículos de identificación de genes implicados en la formación de la madera (Zhao y col., 2000; Whetten y col., 2001; Kirst y col., 2003; Yang y col., 2003; Yang y col., 2003; Dejardin y col., 2004; Karpinska y col., 2004; Paux y col., 2004; Ehrling y col., 2005; Paux y col., 2005; Pavy y col., 2005; Poke y col., 2005; Prassinis y col., 2005; Foucart y col., 2006). La mayoría de estos genes se han identificado en dos experimentos a gran escala basados en secuenciar los ADNc procedentes del tejido xilemático joven de *Pinus taeda* (Allona y col., 1998) y chopo (Sterky y col., 1998).

Hace unos años se ha descubierto en *Arabidopsis* y *Zinnia* que tanto las hormonas CQs y BS como los proteoglicanos y otros compuestos inhibidores de la diferenciación de los elementos traqueales del xilema juegan un papel primordial en este proceso de formación del xilema (Mahonen y col., 2000; Cano-Delgado y col., 2004; Motose y col., 2004; Zhou y col., 2004; Mahonen y col., 2006). En la actualidad se han hecho grandes avances en el estudio de la regulación transcripcional de la formación de la madera en las células y tejidos vegetales (Demura y Fukuda, 2007). A pesar de que *Arabidopsis* es una planta herbácea es muy fácil inducir su vascularización secundaria mediante el crecimiento de las plantas en luz continua y corte posterior de los tallos a medida que se van formando, siguiendo los protocolos descritos por Zhao y col. en el año 2000 y modificados por Oh y col. en el año 2003 (Zhao y col., 2000; Oh y col., 2003). En este proceso se produce una conversión en las células del PC que se

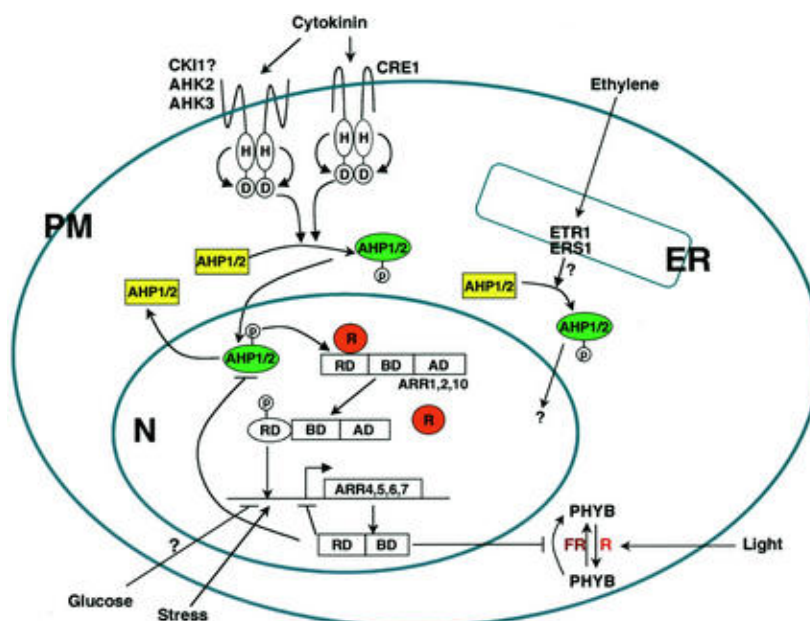
desarrollan y forman las células del cambium a partir de las que se va a desarrollar el floema y el xilema secundario (Nieminen y col., 2004). El crecimiento del tejido vascular secundario depende de la división de las células del cambium vascular que se traduce en un incremento en el grosor de la raíz y el tallo. Se conoce bastante acerca de los mecanismos genéticos implicados en el control de la actividad del cambium y la diferenciación de células de xilema y floema secundarias. Se sabe que las auxinas (AUXs) y CQs son necesarias para la división de las células del cambium y PC. Las AUXs son importantes en el establecimiento y mantenimiento del PC, lugar de expresión del factor de respuesta a AUXs *MP/ARF5 (MONOPTEROS/AUXIN RESPONSE FACTOR5)* (Scarpella y col., 2005). En el PC vascular también se produce la expresión del receptor de CQs *CRE1* (Mahonen y col., 2000), lo que sugiere que el balance entre ambas hormonas es esencial para el desarrollo temprano del tejido vascular. Los genes de las familias de factores de transcripción *KAN* o *HD-ZIPIII* son reguladores negativos y positivos respectivamente de la producción de madera (Demura y Fukuda, 2007). Los microRNAs miR165 y miR166 a su vez controlan los niveles de expresión de los factores *HD-ZIPIII* y de forma indirecta también reprimen la expresión de los genes *KAN* (Bowman, 2004). Las hormonas BS promueven la xilogénesis desde el PC, probablemente por favorecer un aumento en los niveles de expresión de los genes *HD-ZIPIII* (Fukuda, 2004) y por el contrario, estas hormonas reprimen la formación del xilema (Cano-Delgado y col., 2004). Los mutantes alterados en la ruta de señalización de estas hormonas exhiben un fenotipo marcado de pérdida de dominancia apical de la raíz y presentan alteraciones en su patrón vascular lo que se manifiestan por un incremento en las células del floema respecto a las del xilema (Carlsbecker y Helariutta, 2005). Recientemente se han encontrado dos receptores de *Arabidopsis*, *BRL1* y *BRL3 (BRI-1 LIKE RECEPTOR 1 y 3)*, similares al receptor de BS *BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1)* cuyos mutantes presentan anomalías en el tejido vascular (Cano-Delgado y col., 2004).

La expresión del gen *APL* es determinante tanto para la especificación del floema como para la inhibición de la formación del xilema (Bonke y col., 2003). Además se conoce que factores de la familia *HD-ZIP* desempeñan el mismo papel que *APL* en la formación del floema (Baima y col., 2001). Por otro lado, los genes de tipo *NAC* controlan la especificación de las células en protoxilema, metaxilema y fibras (Kubo y

col., 2005; Mitsuda y col., 2005; Zhong y col., 2006). Las hormonas CQs regulan de forma negativa la diferenciación del protoxilema y el gen *AHP6* interacciona con la ruta de señalización de estas hormonas y favorece la especificidad de las células xilemáticas (Mahonen y col., 2006).

El gen *APL* es el primer gen descrito en *Arabidopsis* cuya represión aumenta la producción de tejido xilemático y el gen *AHP6* el primer inductor de xilema conocido. Estos descubrimientos han permitido iniciar la búsqueda de análogos en especies leñosas con la finalidad de incrementar la producción de madera (Kubo y col., 2005; Mitsuda y col., 2005; Zhong y col., 2006). Además se han realizado infinidad de estudios de genes implicados en la producción de madera tanto en especies herbáceas como *Arabidopsis* (Demura y Fukuda, 2007) y *Zinnia* (Fukuda, 2004) como leñosas como *Pinus* (Whetten y col., 2001; Kirst y col., 2003; Yang y col., 2003; Pavy y col., 2005), *Populus* (Dejardin y col., 2004; Sterky y col., 2004), *Robinia* (Yang y col., 2003), *Eucaliptus* (Paux y col., 2004; Poke y col., 2005; Foucart y col., 2006) y *Picea* (Pavy y col., 2005) que están permitiendo desenmarañar la complicada red de genes que intervienen en el proceso de formación de madera tan importante en agronomía.

La ruta de señalización de las hormonas CQs de *Arabidopsis* se ha caracterizado en detalle. Se sabe que éstas actúan uniéndose al receptor de membrana CRE1 y producen la activación del mismo mediante la transferencia de un grupo fosfato de una molécula de ATP a un residuo de histidina del receptor de membrana. A continuación, el grupo fosfato de la histidina se transfiere a un residuo de aspártico y desde ahí se produce la fosforilación de unas proteínas histidin fosfotransferasas (AHP), que median en la respuesta y fosforilan a proteínas reguladoras de la respuesta (ARRs) de tipo B en el núcleo. Estas proteínas reguladoras actúan como represores y se encuentran unidas a los promotores de los genes de la ruta inhibiendo la expresión de otras proteínas ARR. Las proteínas ARR de tipo B median en la respuesta directa. Existen otro tipo de proteínas ARR de tipo A cuya función es desconocida (Hwang y Sheen, 2001; Hwang y col., 2002) (Fig. 4).



**Figura 4. Modelo propuesto por Hwang en el año 2001 del mecanismo de transducción de la señal de citoquininas en *Arabidopsis*.** La señal es percibida por multitud de proteínas histidina kinasa en la membrana plasmática y éstas comienzan una cascada de señalización dependiente de fosfato que conduce a la translocación de proteínas AHP desde el citosol al núcleo. Allí se unen a represores y permiten la expresión de proteínas ARR. RD, dominio de respuesta; BD, dominio de unión a ADN, AD, dominio de activación de la transcripción; PM, membrana plasmática; N, núcleo; R, represor; H, Histidina; D, Aspartato.

#### 4.1.2.- Raíces laterales y adventicias

Las ramificaciones de la raíz principal representan el mayor determinante para la configuración de la AR. El desarrollo de las raíces laterales es un modelo de estudio de los factores que regulan la organogénesis post-embionaria en plantas superiores. La raíz de *Arabidopsis* posee una anatomía muy simple compuesta de líneas celulares epidérmicas, corticales y endodérmicas que rodean el tejido vascular (Dolan y col., 1993; Casimiro y col., 2001). Las raíces laterales en *Arabidopsis* se forman a partir de una serie de células del periciclo que se encuentran adyacentes a los dos polos xilemáticos (Casimiro y col., 2003). El desarrollo de la raíz lateral se caracterizó en el año 1997 cuando Malamy y Benfey definieron los siete estadios que preceden a la emergencia de la raíz (Malamy y Benfey, 1997). Una vez que la raíz emerge, el número de células en el ápice de la raíz lateral aumenta y posteriormente se va elongando con un ángulo predeterminado (Casimiro y col., 2003).



Desde 1982 se sabe que las hormonas AUXs son claves como reguladoras del desarrollo de las raíces laterales (Blakely, 1982; Laskowski y col., 1995). Existen varios mutantes alterados en la ruta de señalización de estas hormonas en los cuáles el desarrollo de sus raíces laterales queda arrestado en uno de las 8 fases del descritas anteriormente (Celenza y col., 1995). Por ejemplo la mutación *alf4* (*aberrant lateral root formation 4*) bloquea el inicio de la raíz lateral, mientras que la mutación *alf3* impide su desarrollo justo antes de la emergencia (Celenza y col., 1995). Los distintos fenotipos que muestran estos mutantes sugieren que las AUXs se requieren en varios estadios del desarrollo de la raíz (Casimiro y col., 2001). Laskowski y col. propusieron que la hormona IAA (Ácido Indol-Acético) es necesaria para que se produzcan las primeras divisiones de las células del periciclo, pero las siguientes son independientes de las AUXs (Laskowski y col., 1995) y antes de llegar a esta fase autónoma, las AUXs llegan a las células del periciclo a través del transporte polar (Reed y col., 1998). En la raíz el transporte polar de AUXs se define como acropétalo si la hormona IAA se desplaza hacia el ápice de la raíz y es basipétalo si se produce en sentido contrario, es decir, la hormona se mueve hacia la base del tallo (Rashotte y col., 2000). Hasta la fecha el transporte polar basipétalo se ha relacionado con respuestas de crecimiento como el gravitropismo (Muller y col., 1998; Marchant y col., 1999; Rashotte y col., 2000), mientras que el acropétalo se relaciona con el desarrollo de raíces laterales (Reed y col., 1998). Casimiro y col. demostraron que si se trata la unión corona con NPA (Ácido N-1-Naftiltalámico), que es un inhibidor del transporte polar de AUXs, el número de raíces laterales disminuye drásticamente (Casimiro y col., 2001).

Por otro lado se sabe que las hormonas BS tienen efectos sinérgicos en las respuestas mediadas por AUXs, pero el mecanismo por el que estas interaccionan entre si aún se desconoce (Bao y col., 2004). Esta interacción se ha confirmado mediante análisis transcriptómico con micromatrices que muestran que muchos de los genes tempranos de respuesta a AUXs están regulados también por BS (Goda y col., 2002; Mussig y col., 2002; Yin y col., 2002). Asimismo las AUXs incrementan la expresión del gen de respuesta a BS *TCH4* (*TOUCH4*) (Xu y col., 1995). La interacción entre ambas hormonas queda también patente en los estudios realizados por Li y col. en el 2001 (Li y col., 2001). Estos autores descubrieron que los mutantes de expresión constitutiva de la forma activa (CA-rop2) y dominante negativa (DN-rop2) para la

proteína GTPasa ROP2 de *Arabidopsis* inducen fenotipos relacionados con las funciones de las AUXs y de los BS y respuestas alteradas a los aportes exógenos de dichas hormonas (Li y col., 2001). Por ejemplo la expresión de CA-rop2 aumenta la dominancia apical del tallo, la formación de raíces laterales, la elongación del hipocotilo y las respuestas que implican a las AUXs y a los BS (Bao y col., 2004). La proteína ROP2 se transporta unida a la actina, lo que sugiere también un papel del citoesqueleto en la regulación y el desarrollo de las raíces laterales. Desde el 2004 se acepta que los BS incrementan el transporte polar de AUXs acropétalo y que la regulación de las hormonas BS en el proceso de formación de las raíces laterales es dependiente de AUXs (Bao y col., 2004).

Las AUXs también participan en la formación de las raíces adventicias. Se ha visto que estas hormonas inducen la formación de raíces adventicias en muchas especies leñosas (Díaz-Sala y col., 1996; Goldfarb y col., 1998; Klerk y col., 1999). La luz también es uno de los principales factores que afectan al desarrollo de raíces adventicias y la luz y las AUXs actúan de manera antagónica en el desarrollo de las raíces adventicias de *Eucaliptus saligna* y *Eucaliptus globulus* (Fett-Neto y col., 2001).

Mientras la fisiología de la formación de las raíces adventicias se conoce bastante bien, los mecanismos moleculares y genéticos implicados en el proceso todavía están poco caracterizados (Sorin y col., 2006). Hasta la fecha se sabe por los estudios realizados en especies leñosas (Han y col., 1994; Marques y col., 1999) y en *Arabidopsis* (King y Stimart, 1998) que es un carácter heredable, cuantitativo y controlado por multitud de factores. Hace unos años se estudió la expresión de genes durante la formación de raíces adventicias en hipocotilos tratados con AUXs en *Pinus contorta*. El resultado de este experimento destacó la expresión diferencial de más de 200 genes (Brinker y col., 2004). En *Arabidopsis* se han aislado nueve mutantes sensibles a la temperatura y alterados a diferentes niveles del desarrollo de las raíces adventicias (Konishi y Sugiyama, 2003). Uno de estos mutantes está alterado en el gen *GEM1* (*GEMINI POLLEN 1*) que codifica para una proteína de unión a microtúbulos lo que otorga un papel al citoesqueleto en este proceso (Sorin y col., 2006). Además existen mutantes sobreproductores de AUXs que espontáneamente generan un mayor número de raíces adventicias, denominados *superroot1* (*sur1*) y *superroot2* (*sur2*) (Boerjan y col., 1995; Delarue y col., 1998). El mutante *argonaute1* (*ago1*) se caracterizó inicialmente

como un mutante alterado en el desarrollo de las hojas (Bohmert y col., 1998) y más tarde se descubrió que presenta alteraciones en la capacidad de producir raíces adventicias (Sorin y col., 2005). El gen *AGO1* está implicado en la regulación del silenciamiento post-traducciona l de genes a través de micro RNAs (Fagard y col., 2000; Jones-Rhoades y Bartel, 2004). El fenotipo defectuoso en la formación de raíces adventicias se debe, al menos parcialmente, a la acumulación del factor de respuesta AUXs *ARF17* (Sorin y col., 2005) cuya expresión está regulada por el miRNA *mir160* que está a su vez controlado por *AGO1* (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Mallory y col., 2005). Estos tres mutantes, *sur1*, *sur2* y *ago1* han sido la herramienta para el estudio de 11 proteínas de *Arabidopsis* implicadas en el desarrollo de raíces adventicias y que sirven de marcadores moleculares (Sorin y col., 2006). Entre ellos se encuentran dos chaperonas y tres proteínas del tipo GH3 inducibles por AUXs (Sorin y col., 2006).

## **4.2.- Factores exógenos**

### **4.2.1.- Sensibilidad a la gravedad**

El gravitropismo es la respuesta de las plantas a la acción de la fuerza gravitacional terrestre. Se puede manifestar como una atracción en las raíces o como una repulsión en los tallos. La respuesta gravitrópica sucede en cuatro pasos: el primero es la percepción de la dirección de la gravedad; el segundo es la conversión de la señal biofísica en una señal bioquímica mediante la activación de una cascada de transducción; el tercer paso es la transmisión de la señal a los tejidos efectores de la respuesta y el cuarto punto comprende la torsión de la raíz o del tallo (Tasaka y col., 1999).

Las células de la columella de la caperuza de la raíz son las encargadas de percibir los cambios en el eje de la gravedad. Estas células contienen unos gránulos de almidón denominados amiloplastos que se sedimentan siguiendo la dirección de la gravedad (Morita y Tasaka, 2004). Para estudiar la importancia de estas células en la respuesta gravitrópica se han realizado estudios de eliminación de las mismas mediante manipulación genética o de ablación con rayos láser. Estos experimentos han mostrado que la ausencia de las células de la columella impide el desarrollo de la respuesta gravitrópica, siendo por tanto las encargadas de percibir los cambios en la gravedad

(Blancaflor y col., 1998; Tsugeki y col., 1998). En los tallos también se han encontrado amiloplastos en varios tejidos, aunque los análisis genéticos realizados con los mutantes *shoot gravitropism1 (sgr1)* y *shoot gravitropism7 (sgr7)*, cuyos tallos no responden a la gravedad mientras sus raíces si, han demostrado que la endodermis posee amiloplastos y es el tejido encargado de percibir la gravedad en los tallos (Fukaki y col., 1998).

Existen dos teorías sobre el modo en el que las plantas perciben la gravedad: el modelo de la presión gravitacional (Staves y col., 1997) y la hipótesis de los estatolitos de almidón, siendo esta última la más aceptada y apoyada por una serie de experimentos realizados en muchas especies vegetales (Sack, 1997). Esta teoría propone que los amiloplastos sedimentan en las células de la columella de la raíz o en la endodermis del tallo en la dirección del eje de la gravedad (Morita y Tasaka, 2004). De hecho el mutante de *Arabidopsis pgm (phosphoglucomutase)* no sintetiza almidón y responde peor a la gravedad en raíz y tallo (Kiss y col., 1989; Weise y Kiss, 1999). En este mutante los amiloplastos no se depositan en la dirección de la gravedad lo que indica que estos gránulos son necesarios para la percepción de la gravedad en todos los órganos (Morita y Tasaka, 2004). La capacidad de respuesta gravitrópica del mutante *pgm* en ausencia de almidón sugiere que existen otros componentes implicados en el proceso de percepción además de los estatolitos (Morita y Tasaka, 2004).

Se piensa que en el proceso de sedimentación de los estatolitos participan flujos de calcio porque se han observado variaciones en los niveles de calcio de las células tras la estimulación gravitrópica (Legue y col., 1996; Plieth y Trewavas, 2002). Se ha postulado que estos flujos de calcio activan una cascada de señalización de inositol en la membrana y de esta forma se transduce la señal (Perera y col., 1999; Perera y col., 2001). Los amiloplastos entonces se depositan y se activan flujos de iones que producen una alcalinización en las células (Scott y Allen, 1999; Fasano y col., 2001; Johannes y col., 2001) y una activación de genes. Hasta el momento el gen más importante descrito es *ARG1/RHG (ALTERED GRAVITROPIC RESPONSE 1/ ROOT AND HYPOCOTYL GRAVITROPIC)*, alterado en un mutante que no presenta respuestas a la gravedad ni en tallo ni en raíz. Este gen codifica para una proteína que contiene un dominio DnaJ y una región de colas que está mayoritariamente asociada a membranas, pero una pequeña región está relacionada con la unión a actina (Sedbrook y col., 1999). Se piensa que la misión de este gen es el transporte de vesículas de una proteína que se requiere para que

se produzca la alcalinización de las células tras la graviestimulación (Boonsirichai y col., 2003).

Sack y col. estudiaron el movimiento de los estatoitos en las células de la raíz y coleoptilos del maíz y observaron que además de la deposición de las células también se produce un estrechamiento del citoplasma y un movimiento de los orgánulos (Sack y col., 1984; Sack y Leopold, 1985; Sack y col., 1985). En tallos de *Arabidopsis* se sabe que la actina participa en el movimiento de los orgánulos mientras que la sedimentación de los amiloplastos se produce en ausencia de fibras de actina (Morita y Tasaka, 2004). Hou y col. en el 2003 publicaron que el tratamiento en raíces y tallos de maíz con latrunculinaB (LatB), droga despolimerizante de filamentos de actina, promueve la respuesta gravitrópica (Hou y col., 2003). La ruptura de los filamentos de actina en las células de maíz aumenta la sensibilidad a la gravedad y las raíces tratadas con LatB muestran mayores curvaturas en sus tejidos (Hou y col., 2003). Además la respuesta gravitrópica se produce a pesar de impedirse el movimiento de los orgánulos de las células (Morita y Tasaka, 2004). Cabe destacar que un mutante dominante de actina que presenta alteraciones en el desarrollo de raíz y tallo también posee una respuesta normal a la gravedad, lo que coincide con los datos observados tras la adición de LatB (Kato y col., unpublished). Los tallos de este mutante también responden de forma normal, lo que indica que la actina no es esencial para la respuesta (Morita y Tasaka, 2004).

El transporte polar de AUXs es esencial para las respuestas trópicas. El transportador de salida de AUXs PIN-FORMED2 (PIN2) que se distribuye de forma asimétrica en las células, y el transportador de entrada de AUXs AUXIN RESISTANT1 (AUX1) juegan un papel importante en el transporte basipétalo de AUXs en la respuesta gravitrópica de la zona de elongación de la raíz (Chen y col., 1998; Luschnig y col., 1998; Muller y col., 1998; Utsuno y col., 1998; Marchant y col., 1999). Además se sabe que las hormonas BS aumentan la polarización basipétala de los transportadores PIN2 en la raíz y aceleran la respuesta gravitrópica (Li y col., 2005). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el que la AUX se transporta lateralmente y genera un gradiente entre la parte superior e inferior de la raíz y el tallo. El regulador del flujo de AUXs PIN3 se expresa en las células de la columella y de la endodermis y puede ser el candidato molecular implicado en la regulación de los gradientes de AUX (Friml y col., 2002). PIN3 se distribuye de forma uniforme en las células de la raíz en condiciones

normales. Cuando la planta se dispone en posición horizontal, la proteína PIN3 se relocaliza en menos de 5 minutos disponiéndose en la cara inferior de las células en respuesta al cambio de orientación de las raíces. Sin embargo esta proteína parece tener un pequeño papel en gravitropismo puesto que el mutante *pin3* apenas exhibe alteraciones en la respuesta gravitrópica (Friml y col., 2002). Puede que la importancia funcional de PIN3 se enmascare debido a la redundancia génica que existe entre los demás miembros de la familia PIN (Morita y Tasaka, 2004).

#### **4.2.2.- Intensidad y calidad de la luz**

El fototropismo es la respuesta que manifiestan los órganos de la planta a la presencia de luz. La luz juega un papel esencial en procesos de desarrollo de la planta como la germinación de las semillas, el proceso de de-etiolación, la expansión de las hojas, la elongación del tallo, la floración y el fototropismo (von Arnim y col., 1997; Correll y Kiss, 2005). Cuando las plantas germinan en oscuridad desarrollan hipocotilos largos con cotiledones cerrados y un característico gancho apical. Por otro lado, en presencia de luz se producen hipocotilos cortos y los cotiledones se abren completamente. Este crecimiento diferencial de las plantas en respuesta a la luz es imprescindible para su supervivencia en el medio natural provocando la elongación en las zonas de sombra para acceder a la luz de una manera más efectiva (Morelli y Ruberti, 2002).

Las plantas perciben la señal lumínica a través de proteínas fotorreceptoras que engloban a los fitocromos que reciben las longitudes de onda roja y roja lejana; los criptocromos para la luz azul y los rayos UV-A; las fototropinas y un nuevo fotorreceptor para los rayos UV-B (Chen y col., 2004). Las raíces poseen un fototropismo negativo a la luz blanca y azul (Okada, 1992; Vitha y col., 2000) y usan los mismos fotorreceptores que los tallos (Sakai y col., 2000). La percepción de la luz ocurre en las células de la caperuza de la raíz de la misma manera que la percepción de la gravedad (Blancaflor y col., 1998; Mullen y col., 2002). En presencia de luz roja las raíces de *Arabidopsis* manifiestan una respuesta de fototropismo negativo no tan intensa como la que se produce en presencia de luz azul o blanca y que es captada por los fotorreceptores de luz roja fitocromo A y fitocromo B, como mostraron los mutantes *phyA* y *phyB* insensibles a la presencia de luz roja (Ruppel y col., 2001; Kiss y col.,

2003). Este fototropismo negativo también ocurre en las raíces laterales (Kiss y col., 2002). En *Arabidopsis* se han identificado 5 fitocromos (PHYA-PHYE) de los que PHYA y PHYB son los más importantes. La luz incluye los procesos relocalización de los fitocromos en la célula y actuación del represor COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) que es una proteína implicada en la degradación de factores de transcripción vía proteosoma (von Arnim y col., 1997; Kircher y col., 1999; Yi y Deng, 2005). Sin embargo, en oscuridad, COP1 se acumula en el núcleo donde degrada los factores de transcripción HY5 (LONG HYPOCOTYL 5), HYH (HY5 HOMOLOG), HFR1 (HYPOCOTYL IN FAR RED1) y LAF (LONG ALTER FAR RED) y además suprime la expresión de genes de respuesta a luz (Ang y col., 1998; Holm y col., 2002; Seo y col., 2003; Jang y col., 2005; Yang y col., 2005; Jonassen y col., 2008). En presencia de luz se degrada COP1 en el núcleo, se activa la expresión de los genes de respuesta y se promueve la fotomorfogénesis (Chamovitz y col., 1996). Los últimos estudios realizados en este campo sugieren que los fitocromos del tallo regulan el desarrollo de las raíces laterales y los fitocromos de la raíz regulan las respuestas fototrópicas y el crecimiento de la raíz principal (Vitha y col., 2000; Ruppel y col., 2001; Correll y col., 2003; Kiss y col., 2003; Salisbury y col., 2007). Laxmi y col. en el 2008 han implicado a las AUXs en este proceso. En su trabajo han demostrado que la luz mantiene la localización en la membrana del transportador de salida de AUXs PIN2 y reduce el almacenamiento vacuolar del mismo (Laxmi y col., 2008).

El papel de la respuesta de las raíces a la luz aún hoy es desconocida, aunque se piensa que puede tener un papel primordial en la optimización de la orientación del sistema radicular completo especialmente en suelos sombríos o en aquellos porosos en los que la luz penetra fácilmente (Mandoli, 1990).

#### **4.2.3.- Hidrotropismo**

La supervivencia de las plantas depende de la capacidad que desarrollen sus raíces para encontrar nutrientes y agua (Eapen y col., 2005). El crecimiento que manifiestan las raíces hacia una fuente de humedad se denomina hidrotropismo. Aunque la falta de agua es uno de los factores más importantes en agricultura, existen muy pocos estudios sobre hidrotropismo (Eapen y col., 2005). Estos estudios comenzaron cuando Knight y Sachs, en 1811 y 1872 respectivamente, descubrieron que las raíces se mueven

hacia el agua (Ingrouille, 1992), pero los primeros mutantes alterados en este comportamiento tardaron en aparecer más de 19 años después que los relacionados con el gravitropismo, ya que el hidrotropismo es mas complejo de estudiar y al gravitropismo siempre se le concedió se le concedió injustamente mayor importancia (Olsen, 1984; Eapen y col., 2003). Por eso, aún hoy por hoy es un campo prácticamente desconocido (Eapen y col., 2005).

Cuando las plantas colonizan un sustrato tienen que vencer la fuerza de la gravedad para encontrar agua (Niklas, 1997). Por eso, las primeras plantas vasculares enseguida desarrollaron sistemas morfológicos de raíz más complejos. Las raíces de las plantas ancestrales eran más parecidas a los tallos y evolucionaron hasta convertirse en las actuales ARs adquiriendo como paso importante la caperuza de la raíz (Barlow, 1992). Este órgano de la raíz controla muchos de los procesos bioquímicos y fisiológicos que son cruciales para la supervivencia de las plantas, como el gravitropismo, el hidrotropismo y la respuesta de choque (Barlow, 2003). Como ya apuntó Charles Darwin en su libro “El poder del movimiento de las plantas” no es descabellado decir que las plantas tienen cerebros en la caperuza de la raíz (Darwin, 1880). Desde entonces se le prestó mucha atención a la implicación de la caperuza de la raíz en el gravitropismo. Sin embargo, esta respuesta puede cambiar por efecto de los gradientes de humedad y otros factores que controlan la arquitectura de la raíz (Eapen y col., 2005).

Es muy difícil estudiar las respuestas hidrotrópicas porque la respuesta de las raíces a la gravedad interacciona con el hidrotropismo positivo de las plantas (Takahashi y Scott, 1991; Takahashi y col., 1996). Para evitar el componente gravitacional se han realizado estudios en mutantes agravitrópicos o en situaciones de microgravedad en el espacio que han servido para diferenciar ambas respuestas (Takahashi, 1997). El mutante agravitrópico de guisante *ageotropum* es una evidencia clara de la independencia de estos procesos, ya que responde al hidrotropismo mientras es insensible a la acción de la gravedad (Jaffe y col., 1985). Se conoce muy poco acerca de los mecanismos moleculares que se desencadenan en la caperuza de la raíz para integrar las respuestas de gradientes de agua, choque, gravedad y otros estímulos que generan un crecimiento de la raíz (Eapen y col., 2005). Ha sido relevante el estudio del mutante *nhr1* (*non hydrotropic response 1*) de *Arabidopsis*. La raíz de este mutante crece en forma de ondas con la respuesta de choque activada y responde rápidamente a la



gravedad, pero sin embargo es incapaz de responder a los gradientes de humedad (Okada K. y Shimura, 1990; Mullen y col., 1998). Este mutante posee grandes amiloplastos en las células de la columella de la raíz y esta es posiblemente la causa de su velocidad alta de respuesta a la gravedad (Eapen y col., 2003). *nhr1* es insensible a la adición de ácido abscísico (ABA), de la hormona AUX NAA (ácido 1-naftilacético) y del inhibidor del transporte polar de AUXs NPA (Eapen y col., 2003) y no desarrolla la respuesta hidrotópica, lo que sugiere un papel del ABA en el transporte polar de AUXs necesaria para la respuesta hidrotópica (Eapen y col., 2005).

#### 4.2.4.- Presencia de nutrientes

La capacidad de las plantas para responder a la disponibilidad de los nutrientes es fundamental en su adaptación al medioambiente. La escasez de nutrientes como el nitrato, el fosfato y el hierro funcionan como señales que activan procesos de división y diferenciación celular y tienen un profundo impacto en la arquitectura radicular de la planta. Los nutrientes del suelo son imprescindibles para el crecimiento de la planta y la productividad (Lopez-Bucio y col., 2003) y a menudo la disponibilidad a los mismos se encuentra limitada. La planta modifica la configuración espacial de la raíz en función de la capacidad que posea para adquirir los nutrientes del sustrato. La disposición de los nutrientes produce cambios en la regulación de la iniciación (1), en el desarrollo (2) y en el crecimiento de las raíces laterales (3) (Malamy, 2005).

##### 1. Efecto de la disponibilidad de nutrientes en la regulación de la iniciación de las raíces laterales:

Los nutrientes más influyentes en la regulación del inicio de la formación de raíces laterales son el balance entre carbono y nitrógeno, el sulfato y las acumulaciones localizadas de nitrato, amonio y fosfato (Malamy, 2005). Malamy y Ryan en el año 2001 realizaron una serie de ensayos para determinar los mecanismos que controlan la activación del número de inicios de raíces laterales en presencia de nutrientes determinados (Malamy y Ryan, 2001). Estos autores encontraron que cuando las plantas de *Arabidopsis* se crecen en un medio con un balance elevado de sacarosa/nitrógeno, la iniciación de raíces laterales se inhibe completamente y este proceso va acompañado de una acumulación de AUXs en el hipocotilo, lo que sugiere que el transporte de AUXs desde el tallo a la raíz se bloquea como respuesta al elevado balance entre carbono y

nitrógeno. En estas condiciones se ha aislado el mutante *lin1* (*lateral root initiation 1*), que desarrolla raíces laterales normales en presencia de un balance elevado de sacarosa/nitrógeno (Malamy y Ryan, 2001). Este mutante está alterado en el gen que codifica para el transportador de nitrato de alta afinidad NTR2.1 (NITRATE TRANSPORTER 2.1), no acumula AUXs en el hipocotilo (Little y col., 2005) y las diferencias en su crecimiento se deben a la falta de actividad del transportador de nitrato (Krapp y Videle, com. personal). El transportador NTR2.1 por tanto en condiciones normales detecta la falta de nitrógeno y como consecuencia las AUXs se acumulan en el hipocotilo y se inhibe la iniciación de las raíces laterales (Malamy, 2005). Por el contrario, las plantas que crecen en bajo sulfato muestran un aumento en el número de inicios de raíces laterales (Kutz y col., 2002). Se sabe que este incremento se debe a la inducción del gen de la nitrolosa NIT3 que produce AUX IAA desde un precursor (Malamy, 2005). También se ha visto un incremento en el número de inicios de raíces laterales en presencia de zonas localizadas de fosfato, nitrato o amonio (Drew, 1975; Zhang y Forde, 1998). Esta ruta parece ser independiente de las AUXs, puesto que los mutantes de síntesis *axr4* (*auxin resistant 4*) y *aux1* tienen respuestas similares a las plantas silvestres (Linkohr y col., 2002).

## 2. Efecto de la disponibilidad de nutrientes en el desarrollo y activación del primordio de las raíces laterales:

Los cambios en la AR relacionados con el desarrollo del primordio y la activación y emergencia de las raíces laterales se deben fundamentalmente al nitrógeno y al fósforo. El nitrógeno es uno de los componentes más abundantes de la tierra, pero también es el más limitante debido a su baja disponibilidad en el suelo. El nitrato es el fertilizante más común, pero debido a su enorme solubilidad, la mayoría se pierde por lixiviación o por desnitrificación bacteriana (Vance, 2001). La falta de nitrato provoca en las plantas un aumento en el desarrollo de raíces laterales, pero no en su longitud y, por el contrario, induce una disminución en la longitud de la raíz principal (Zhang y Forde, 1998), creando sistemas fasciculados. Zhang y Forde han realizado la mayoría de los experimentos relacionados con la regulación del nitrato. Estos autores demostraron que concentraciones homogéneas de nitrato de 10 mM reprimen el desarrollo de las raíces laterales en un estadio inmediatamente anterior a la activación del meristemo de la raíz (Zhang y col., 1999). La inhibición por nitrato es mucho más acusada en un mutante de una nitrato-reductasa. Estos datos sugieren que es el nitrato en sí, más que su

metabolización, es el responsable del proceso lo que indica que el nitrato puede ser un señalizador por si mismo (Zhang y col., 1999). Por otro lado se conoce que la hormona ABA está implicada en esta respuesta. El desarrollo de las raíces laterales está más inhibido por nitrato en los mutantes de síntesis de ABA, *abi4* y *abi5* (*aba insensitive 4* y *5*) (Signora y col., 2001). El ABA reprime el desarrollo de las raíces laterales en el estadio de activación del meristemo radicular y es independiente de la señalización por AUXs (Malamy, 2005).

El segundo nutriente más limitante es el fósforo porque enseguida se une a otros iones y forma complejos insolubles para la planta (Guerinot y Yi, 1994). La deficiencia de fósforo genera en la planta una respuesta similar de acortamiento de la raíz principal y proliferación masiva de pelos radiculares (Schmidt y col., 2000). Linkohr y col. estudiaron la respuesta que se produce en presencia de fósforo y manifestaron una disminución en el número de raíces laterales como consecuencia de un aporte alto de fósforo (Linkohr y col., 2002). Este arresto del crecimiento se produce en un estadio del desarrollo en el que el primordio ya está formado, pero todavía no ha emergido de la raíz principal (Malamy, 2005). Por el contrario, cuando las plantas crecen en condiciones de bajo fósforo, aumenta el desarrollo de las raíces laterales (Lopez-Bucio y col., 2002). En esta ruta existen evidencias de la participación de las AUXs, ya que las plantas que crecen en condiciones de ayuno de fósforo son más sensibles a estas hormonas y menos sensibles al inhibidor del transporte de AUXs TIBA (Ácido 2,3,5-triiodobenzoico) (Malamy, 2005). Por otra parte, el mutante *iaa28* de señalización de la ruta tiene un número menor de raíces laterales en bajo fósforo, aunque otros mutantes de síntesis se comportan como las plantas silvestres y los mutantes *aux1-7* y *pin1* de transporte de AUXs desarrollan pocas raíces laterales en condiciones de alto fósforo (Lopez-Bucio y col., 2002). Recientemente se ha aislado el mutante hipersensible al ayuno de fósforo *pdr* (*phosphate deficiency response*) (Ticconi y col., 2004). El principal defecto de este mutante aparece en condiciones de ayuno de fósforo cuando el primordio lateral emerge de la raíz principal, pero los nuevos meristemos pierden viabilidad. Este fenotipo sugiere que existe un mecanismo esencial para proteger el meristemo de la raíz de las condiciones de ayuno de fósforo (Malamy, 2005).

### 3. Efecto de la disponibilidad de nutrientes en la elongación de las raíces laterales:

El crecimiento de las raíces laterales está controlado a su vez por acumulaciones localizadas de nitrato y fosfato y por las vías de regulación del fosfato. En 1998 Zhang y Forde demostraron que un incremento localizado de nitrato en el medio de cultivo provoca un crecimiento diferencial en la zona de acumulación de nitrato (Zhang y Forde, 1998) y Linkohr y col. demostraron que ese crecimiento diferencial se debe también a una inhibición del crecimiento en la zona de bajo nitrato (o fosfato) (Linkohr y col., 2002). Se sabe que el responsable de la estimulación del crecimiento de las raíces laterales en condiciones de zonas localizadas de nitrato es un factor transcripcional del tipo caja MADS inducible por nitrato, que se descubrió en el mutante *Arabidopsis anr1* (*nitrate regulador 1*) cuando se vio que sus raíces laterales eran insensibles a la presencia de nitrato localizado (Zhang y col., 1999). Se piensa que bajo las respuestas de nitrato localizadas se produce una señalización de AUXs, puesto que el mutante de síntesis de AUXs *axr4* o responde a aportes localizados de nitrato.

Como se ha mencionado anteriormente, los aportes homogéneos de fosfato en el medio conducen a una reducción en la tasa de crecimiento de las raíces laterales, acompañado de un crecimiento de la raíz principal y de una disminución de la densidad de raíces laterales, lo que sugiere que el ayuno de fosfato conlleva una elongación de la raíz lateral y en condiciones de alto fosfato se produce una elongación de las raíces laterales (Williamson y col., 2001). Además se ha observado una respuesta curiosa a la disponibilidad de fosfato. Este nutriente suele estar disponible en las capas más superficiales del sustrato y se ha visto que algunos genotipos de judía, soja y guisante responden al ayuno de fosfato disminuyendo el ángulo de crecimiento de sus raíces laterales (Bonser y col., 1996; Malamy, 2005). El efector de esta respuesta puede ser el etileno (Lynch y Brown, 1997).

La capacidad que posee la planta *Lupinus albus L.* de generar unas estructuras granulares que actúan como reservorio de fosfato y que se denominan proteoides ha hecho que este sea un sistema modelo para el estudio de la respuesta de ayuno de fosfato (Neumann, 2000; Neumann y Martinoia, 2002). En *Arabidopsis* se ha comprobado que se produce un aumento en el número de raíces laterales en condiciones de bajo fosfato y quizás exista una conexión entre la producción de proteoides y la formación de raíces

laterales (Lopez-Bucio y col., 2002). A pesar de la cantidad de información que existe de la expresión de genes en condiciones de ayuno de fosfato, se conoce muy poco acerca de los componentes de la señal de transducción de la ruta (Mukatira y col., 2001; Mudge y col., 2002). Los últimos resultados se basan en la identificación del mutante *phr1* (*phosphate response regulator 1*) de *Arabidopsis*, que presenta alteraciones de crecimiento en la relación raíz/tallo en condiciones de ayuno de fosfato. El gen causante de la mutación es un factor de transcripción de tipo MYB que se ha visto que interacciona con secuencias de ADN que se ubican en promotores de respuesta de ayuno de fosfato. El gen *PHR1* por tanto funciona como un regulador transcripcional en la señalización de la respuesta a la carencia de fosfato (Rubio y col., 2001).

#### **4.2.5.- Interacciones con microorganismos del suelo**

Las raíces de las plantas establecen interacciones con otros organismos del suelo. Estas relaciones pueden ser parasíticas o simbióticas. En las interacciones parasíticas un organismo patógeno invade y coloniza a la planta sin ofrecerle ningún beneficio a cambio, como sucede con determinados virus, hongos, bacterias e incluso con otras plantas como el muérdago. Sin embargo, en las relaciones simbióticas ambos organismos obtienen beneficios. En este apartado merecen una mención especial los nódulos de fijación de nitrógeno que se originan en la raíz de las leguminosas como resultado de la interacción con bacterias del género *Rhizobium*. A lo largo de la evolución, estos sistemas se han desarrollado conjuntamente y la planta ha elaborado una respuesta defensiva diferente ante la presencia de un ataque de un patógeno o la invasión de un organismo simbiote (Kuc, 1987; van Wees y col., 1999; Jakab, 2001)). La respuesta defensiva incluye un estrechamiento de la pared celular para aislar la zona dañada (Stumm, 1986; Schmele, 1990), estrés oxidativo (Doke y col., 1996), expresión de varios genes de defensa (Ryals y col., 1996; Sticher y col., 1997) y una respuesta hipersensible (Mittler, 1996), que a menudo es sistémica y se transmite a lo largo de toda la planta e incluso a las plantas vecinas a través de elicitores volátiles, como el ácido salicílico (Conrath y col., 2002).

En la formación de nódulos de fijación del nitrógeno atmosférico la interacción entre las bacterias y las plantas se establece debido a la liberación de señales químicas entre ambos. Así la planta libera flavonoides por la raíz que activan la expresión de los

genes *nod* bacterianos produciéndose los factores NOD que actúan como morfógenos que bajo condiciones limitantes de nitrógeno inducen a las células de la raíz a dividirse hasta producir los nódulos (Schultze y Kondorosi, 1998; Marquez y col., 2005). Se ha encontrado una conexión entre nodulación y elongación de raíces laterales en *Lotus japonicus*, ya que una mutación en el gen *HARI* (*HYPERNODULATION ABERRANT ROOT 1*) origina un fenotipo de hipernodulación en presencia de *Rhizobium* y en su ausencia se desarrollan raíces laterales de manera muy abundante en su raíz (Krusell y col., 2002; Nishimura y col., 2002).

En este punto cabe destacar las micorrizas como la interacción simbiótica mutualista más importante de la Tierra. Las micorrizas son la interacción que se desarrolla entre las raíces de una planta y un hongo. Las micorrizas arbustivas que se desarrollan entre las raíces de una planta y especies de hongos del género *Zygomycota* son los tipos de micorrizas más abundantes (Strack y col., 2003). El hongo crece en el interior de las células de la corteza de la raíz y origina hifas que se ramifican enormemente generando arbuscúlos (Perotto y Bonfante, 1997). Estas estructuras son las responsables del intercambio de nutrientes entre el hospedador y el huésped. El hongo recibe de la planta carbohidratos y la planta capta agua y fósforo, con lo que adquiere una mayor capacidad adaptativa al entorno en suelos donde el fósforo es limitante. En estos sustratos, las plantas han adaptado sus sistemas de captación de fósforo a la interacción con el hongo aumentando la síntesis de transportadores específicos de fósforo (Strack y col., 2003).

Por otro lado, la colonización de las células de la raíz induce cambios bruscos en la organización citoplásmica. Se produce fragmentación vacuolar (Balestrini y col., 2005) transformación de la membrana plasmática en una membrana que recubre los arbuscúlos (Fester y col., 2001; Hans y col., 2004), aumenta el volumen citoplásmico y el número de orgánulos celulares (Perotto y Bonfante, 1997) y el núcleo se dispone en una localización central (Balestrini y col., 1996). Además los plastidios forman una red densa que recubre la superficie de contacto entre la planta y el hongo (Fester y col., 2001; Hans y col., 2004). Es muy probable que los microtúbulos y los microfilamentos de actina estén implicados en todos estos cambios. El citoesqueleto de la planta responde a la colonización del hongo mediante una reorganización de los microtúbulos y los microfilamentos (Timonen y Peterson, 2002).

Las hormonas CQs aumentan sus niveles en plantas que establecen micorrizas con hongos (Allen y col., 1980) y la aplicación exógena de la hormona ácido jasmónico favorece la interacción (Hause y col., 2002).

En resumen, tanto los nódulos como las micorrizas son estrategias fundamentales para aumentar la eficiencia en la captación de los nutrientes más limitantes del sustrato, nitrógeno y fósforo respectivamente y confieren a las plantas ventajas en suelos pobres. Estas interacciones modifican la disposición y la morfología de la raíz y son determinantes para el establecimiento de la AR definitiva de la planta.

#### **4.2.6.- Presencia de obstáculos**

La raíz principal de *Arabidopsis thaliana* posee una gran plasticidad y crece en forma de ondas, círculos y torsiones ante la presencia de un determinado obstáculo del terreno (Migliaccio y Piconese, 2001). Estos patrones de crecimiento de la raíz le permiten reconocer y colonizar el sustrato de manera más eficaz.

Cuando una planta de *Arabidopsis thaliana* se dispone sobre una placa dispuesta con un ángulo de inclinación de 45° respecto a la horizontal, su raíz principal comienza a crecer en forma de ondas, ya que el meristemo radicular choca con la superficie del agar hacia un lado y otro y esto obliga a la raíz a cambiar alternativamente su dirección de crecimiento. Este movimiento zigzagueante es distinto al que se produce cuando se crecen las plantas sobre una superficie de agar muy dura. En este caso el giro de la raíz se produce siempre en el mismo sentido que las agujas del reloj, dando la sensación de círculos sobre la superficie del agar (Massa y Gilroy, 2003). Al mismo tiempo, existen ecotipos de *Arabidopsis* con un patrón predeterminado de crecimiento de su raíz principal al crecer esta girando sobre si misma originando un desplazamiento lateral hacia la derecha respecto al eje gravitacional cuando se miran las plantas desde arriba. Este tipo de crecimiento denominado circumnutación está más relacionado con el concepto de lateralidad, que se refiere a la predeterminación genética de la localización de los órganos de un determinado organismo en relación con su eje de simetría. En *Arabidopsis* se conoce muy poco de la lateralidad en raíces y de los mecanismos moleculares implicados en este proceso, aunque desde hace años se han identificado

mutantes alterados en esta respuesta y la mayoría de ellos se han relacionado con los microtúbulos. Los mutantes *spiral1* y *spiral2* presentan una torsión exagerada en el sentido de las agujas del reloj y hacia el mismo lado que la planta silvestre y codifican para proteínas de unión a microtúbulos (Furutani y col., 2000; Nakajima y col., 2004; Shoji y col., 2004). A partir del mutante *spiral2* se realizó una segunda mutagénesis con el objeto de seleccionar mutaciones supresoras para identificar más componentes de la ruta. De esta forma se seleccionaron los mutantes *lefty1* y *lefty2* por su giro contrario al de los mutantes *spiral*. Cuando se clonaron se descubrió que los genes alterados codificaban para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina, resaltando de esta forma la implicación directa de esta proteína en la circumnutación (Thitamadee y col., 2002).

Todas estas respuestas de crecimiento de la raíz principal se basan en la combinación de varios procesos: la circumnutación, el gravitropismo y el tigmotropismo. En primer lugar la circumnutación, mencionada anteriormente es la torsión de la raíz principal sobre el eje de dirección de crecimiento; el gravitropismo (también definido anteriormente) es el proceso por el cual las raíces de las plantas crecen en la dirección del vector gravitatorio; hacia el sentido del campo gravitatorio terrestre (gravitropismo positivo) o los tallos en sentido contrario (gravitropismo negativo) y el tigmotropismo se refiere al movimiento característico que realizan las plantas trepadoras al enrollarse sobre un soporte (tigmotropismo positivo). Sin embargo, en el caso de las raíces de las plantas es el movimiento que ocurre como medida de evitar obstáculos (tigmotropismo negativo) (Migliaccio y Piconese, 2001). Todos los movimientos de la raíz se producen por la suma de los procesos circumnutación, gravitropismo positivo y tigmotropismo negativo en las células del ápice de la raíz. Así pues en función de la fuerza que prevalezca, el resultado del movimiento será diferente. Este crecimiento de la raíz principal se denomina respuesta de choque cuando existe un obstáculo en el terreno que funciona de estímulo mecánico y desencadena la respuesta de giro con el fin de esquivar el obstáculo (Braam, 2005).

Las respuestas rápidas de la raíz se engloban principalmente en dos categorías: tigmonásticas y tigmotrópicas según la influencia del estímulo en la dirección del movimiento. Son respuestas trópicas si ocurren en una dirección determinada por el lugar o dirección del estímulo y násticas si ocurren en una dirección claramente independiente de la del estímulo (Braam, 2005). Los estímulos mecánicos pueden ser



choque, daño, oscuridad, elevadas temperaturas y hormonas que promueven el crecimiento. La oscuridad produce cambios en la regulación de apertura de los estomas y por ello los cambios de humedad pueden dar lugar a respuesta similares a las observadas en la respuesta de choque (Braam, 2000). La oscuridad y las hormonas que inducen el crecimiento, como los BS y las AUXs, provocan elongación celular también característico de la respuesta de choque (Antosiewicz y col., 1995; Xu y col., 1995). Las temperaturas altas producen cambios en el turgor celular que también inducen una respuesta de choque (Braam, 2005).

Algunos autores sugieren que la respuesta de choque que se produce en las raíces es consecuencia exclusivamente de la fuerza mecánica que supone la presencia de un obstáculo en el terreno y es la propia elongación de la raíz durante su crecimiento la que obliga a cambiar la dirección. Por tanto se piensa que no existen mecanismos moleculares específicos de la respuesta de choque sino que de forma secundaria existen genes que varían su expresión como consecuencia del brusco cambio en la dirección de crecimiento (Thompson y Holbrook, 2004) y no al contrario. Sin embargo, desde que se definió el concepto de “respuesta de choque” (Massa y Gilroy, 2003) se han tratado de averiguar los mecanismos moleculares implicados en la activación y señalización de este comportamiento y se ha visto por hibridación tipo northern que las hormonas giberelinas (GAS), AUXs, CQs y ABA deben jugar un papel importante puesto que se acumulan cuándo se induce la respuesta (Braam y Davis, 1990). La secuenciación masiva de una librería de cDNA preparada a partir de plantas sometidas a choque ha permitido identificar una grupo muy numerosa de genes denominados TCH que se inducen durante esta respuesta (Ling, 1991; Perera y Zielinski, 1992; Gawienowski, 1993; Botella y Arteca, 1994; Botella y col., 1996; Mizoguchi y col., 1996; Oh, 1996; Royo y col., 1996; Shirsat, 1996; Eldick, 1997; Mauch y col., 1997; Gilmour y col., 1998; Hirsinger, 1999; Tatsuki y Mori, 1999; Müssig, 2000; Oufattole y col., 2000; Lee y col., 2005). Hasta el momento, los grupos de genes TCH más relevantes han sido cinco. El primero engloba a proteínas relacionadas con el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ ; el segundo grupo lo constituyen proteínas de pared (Braam y Davis, 1990; Sistrunk y col., 1994; Xu y col., 1995; Khan y col., 1997; Rose y col., 2002; McCormack, 2003). Sin embargo, el tercer grupo comprende proteínas relacionadas con resistencia a enfermedades por lo que parece que existe una relación aún desconocida entre los genes que se activan en presencia de un estímulo mecánico y la respuesta de las plantas al ataque por patógenos.

En el cuarto grupo se encuentran representados genes que codifican para proteínas quinasas y el último se corresponde con factores de transcripción (Lee y col., 2005). En *Arabidopsis* la hibridación de una micromatriz que representaba a 22810 genes mostró que 589, un 2.5% del genoma, aumentaban su expresión a los 30 minutos de estimular de la respuesta de choque (Lee y col., 2005).

Los mecanismos moleculares que controlan la expresión de los genes implicados en la respuesta no se conocen muy bien, aunque parece que juegan un papel importante los flujos intracelulares de calcio y la fosforilación de proteínas (Braam, 2005). En la planta *Mimosa pudica* se ha demostrado que la inhibición de la fosforilación de la actina inhibe la respuesta tigmotónica de las hojas (Braam, 1992; Kameyama y col., 2000; Wright y col., 2002). En esta respuesta las plantas de *Mimosa* cierran sus hojas en respuesta al contacto. Kameyama y col. descubrieron que este proceso es dependiente de que la actina se defosforile, de forma que si se tratan las hojas con un inhibidor de fosfatasas se impide la respuesta y las hojas permanecen estiradas (Kameyama y col., 2000). En *Arabidopsis* se han encontrado mutaciones en la subunidad A de la proteína fosfatasa 2A en el mutante *rcn-1* (*roots curl in NPA-1*) que impiden la respuesta de choque de la raíz (Deruere y col., 1999).

Las células de la columella de la raíz son las encargadas de percibir los cambios de gravedad y se ha comprobado que si se destruyen aplicando un rayo láser, la planta es incapaz de responder al choque. El mutante *pgm-1*, que presenta deficiencias en la percepción de la gravedad, tampoco desarrolla la respuesta de choque (Massa y Gilroy, 2003). Por otro lado se sabe que las AUXs participan también en la respuesta de *Arabidopsis*. El mutante *wvc1* (*wavy and compressed root*) alterado en el gen *ASA1* (*ANTRANILATO SINTASA 1*) muestra un fenotipo de hiperactivación de la respuesta. El gen *ASA1* codifica para una enzima que cataboliza un paso previo a la síntesis del triptófano (trp). Una derivación de esa ruta origina la hormona AUX IAA, lo que implica de forma directa a esta hormona en la respuesta (Sedbrook y col., 1998). En la bibliografía existen otros mutantes, *trp3-1* y *trp2-1* (que codifican para las proteínas  $\alpha$  y  $\beta$  triptófano sintasa 1, respectivamente), cuyo fenotipo de activación de la respuesta confirma el papel de las AUXs en este proceso (Rutherford y col., 1998). En el 2006 se identificaron dos mutantes de *Arabidopsis* de expresión constitutiva de la ruta de choque de la raíz cuyos genes alterados codifican para dos proteínas Ser/Thr kinasas, WAG1 y

WAG2. Estas proteínas son similares al regulador positivo del transporte polar de AUXs PINOID y reprimen la cascada de señalización de la ruta de choque (Santner y Watson, 2006). Además de las AUXs, la hormona etileno modula las respuestas trópicas de la raíz. Buer y col. en el 2003 descubrieron que suministrando concentraciones crecientes de etileno en el medio las raíces activaban la respuesta de choque de la raíz (Buer y col., 2003).

En la actualidad aún se conoce muy poco acerca de los mecanismos implicados en AR. Los factores que controlan tanto los patrones predeterminados genéticamente como los adaptativos a las condiciones del suelo siguen siendo un enigma. En muchos casos los resultados obtenidos se han basado en aproximaciones indirectas. En esta tesis abordamos la identificación de mutantes alterados en la disposición espacial del sistema radicular con el fin de identificar genes implicados en este proceso de gran importancia agronómica.

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de esta tesis es la identificación de genes implicados en el control de la arquitectura radicular mediante una aproximación genético molecular. Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Establecimiento de un método de identificación de mutantes alterados en su arquitectura radicular.
2. Identificación de mutantes alterados en la disposición de sus raíces en una población mutagenizada por EMS con especial atención en aquellos alterados en dominancia apical, disposición de inicios de raíces laterales y fenotipos de torsión.
3. Caracterización fenotípica, respuesta a hormonas y análisis histológico de los mutantes seleccionados.
4. Análisis de complementación
5. Localización cromosómica de las mutaciones responsables.
6. Identificación de los genes mutados por paseo cromosómico.
7. Complementación, sobre-expresión y análisis de epistasia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.- MATERIAL BIOLÓGICO

#### 1. 1.- Plásmidos

- pBluescript sK (+/-) derivado de pUC19 (Stratagene).
- 27pAA2 (Ringli y col., 2002) derivado del pART7 (Gleave, 1992), que contiene el promotor de la ACTINA2 fusionado al cDNA de la actina2.
- pDONOR207 (Invitrogen) y pAGRIKOLA (Invitrogen).

#### 1. 2.- Estirpes bacterianas

- *Escherichia coli*, cepa DH5 $\alpha$  (Woodcock y col., 1989).
- *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Yanofsky y Nester, 1986)
- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101-pmp90+psoup (Gateway)- AGRIKOLA (Invitrogen).

#### 1.3.- Material vegetal

- *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotipos Columbia-0 (Col), Landsberg erecta (Ler), Cape verdi islands (Cvi) y Wassilewskija (Ws).
- Colección de semillas mutagenizadas con EMS de LEHLE ([www.arabidopsis.com](http://www.arabidopsis.com)), de la que proceden los mutantes *raw2*, *raw3* y *wavy*.
- Línea N548987 de inserción de T-DNA para el gen At3g18780, línea N384171 para el gen At5g09810 y línea N337462 para el gen At1g49240 de la colección de NASC (Nottingham Arabidopsis Centre).
- Mutantes alterados en la ruta de los BS y de las CQs, *bzr1-ID* (Wang y col., 2002) *raw1* (de Leon y col., 2004) y *wol* (Mahonen y col., 2000; Inoue y col., 2001) respectivamente.
- Línea transgénica Dr5Gus, indicadora de gradiente de AUXs (Ulmasov y col., 1997) y PIN2-GFP (Muller y col., 1998).

## **2.- TIPOS DE CULTIVOS**

### **2. 1.- Cultivo de estirpes bacterianas**

El crecimiento de las estirpes bacterianas se realizó utilizando medio líquido Luria-Bertani (LB), (Sambrock J., 1989). El medio sólido se obtuvo añadiendo al medio LB líquido un 15% de Bactoagar (Disco). Para poder seleccionar las cepas bacterianas se usaron los siguientes antibióticos: ampicilina y espectinomicina a una concentración de 100 mg/l y rifampicina a 50 mg/l. El crecimiento de las bacterias se realizó en una cámara en el caso de placas sólidas y en un agitador a 200 r.p.m. cuando el cultivo era líquido. La temperatura de crecimiento fue 37°C para *E.coli* y 28°C para *A.tumefaciens*. La conservación se consiguió a -80°C con el uso de glicerol al 50% sobre el cultivo líquido, obteniendo un congelado al 15% de glicerol.

### **2. 2.- Cultivo de plantas**

#### **2. 2. 1- Cultivo “in vitro” de *Arabidopsis thaliana***

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* necesitan pasar por un período de estratificación en frío (a 4°C) para que puedan germinar, por esta razón la esterilización de las semillas se realizó tres días antes de que fueran sembradas en las placas para su cultivo en las cámaras. La esterilización se efectuó con una solución de lejía al 75% y Tween-20(sigma) al 0,01% durante 5 minutos y con agitación brusca; posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos con agua MiliQ estéril y, por último, se añadió agarosa al 0,15% y se incubaron las semillas en una cámara de 4°C en oscuridad.

Se empleó el medio Jhonson, el de Murashige y Skoog (MS, Duchefa) y el medio MSBN al 0,5X y al 1X con 5 gr/L de sacarosa, 0,5 gr/L de MES y 1mM de KNO<sub>3</sub> en lugar de 17mM que lleva el medio MS. El pH se ajustó a 5.6 con KOH (Merck). Como agente solidificante se usó bactoagar al 1% para placas dispuestas en un soporte vertical con un ángulo de 90° respecto a la horizontal; 1,5% para placas dispuestas con un ángulo de 45° y de 0,6% para placas horizontales que sirvieron para recuperar plantas crecidas en medio vertical e inclinado y para seleccionar plantas



transgénicas. La selección de éstas se llevo a cabo con el uso de kanamicina a una concentración de 50 mg/l.

Cuando los medios todavía estaban calientes fueron suplementados antes de distribuirlos en las placas con kinetina (6-Furfurilaminopurina) a 60  $\mu$ M, 2,4-D (Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético) a 100  $\mu$ M, 24-epibrasinolide (EBL) a 1, 2 y 5 nM, con citocalasinaD (CitD) a 1  $\mu$ M, con LatB a 17 nM con 1  $\mu$ M de taxol, con 2  $\mu$ M de propizamida y con vanadato a 50  $\mu$ M.

Las condiciones de cultivo fueron 22 °C, 60% de humedad relativa y 8000 lux de intensidad lumínica, con luz fluorescente mixta blanca/roja y un fotoperiodo de 16 horas de iluminación y 8 de oscuridad.

#### **2.2.1.1.- Cultivo de callos**

Para permitir el desarrollo de callos a partir de hipocotilos y raíces de las plantas se sembraron las semillas en medio MS-0,5 X en placas horizontales y se taparon con varias capas de papel Albal para mantenerlas en oscuridad durante una semana. A continuación, se abrieron las placas y se cortaron trozos de 1 cm de longitud de hipocotilos y raíces. Estos fragmentos se dispusieron en placas horizontales con 0,6 % de Bacto-agar en presencia de 100  $\mu$ M de la hormona 2,4 D y 60  $\mu$ M de la hormona kinetina. Se dejaron formar los callos y se tomaron fotografías de los mismos al cabo de 2, 3 y 4 semanas.

#### **2. 2. 2- Cultivo en tierra de *Arabidopsis thaliana*.**

Las semillas y plántulas recuperadas de cultivo “in vitro” de *A.thaliana* se dispusieron en macetas humedecidas que contenían una mezcla 3: 1 de sustrato universal (Brill) y vermiculita. En el caso de las semillas se procedió a la estratificación posterior a la siembra en una cámara de 4°C y en oscuridad durante tres días. Las condiciones de cultivo fueron de 22 °C y luz blanca, con un fotoperiodo de 16 horas de insolación y 8 de oscuridad, tanto en invernadero como en cámaras climáticas (Fitotron y Conviron).

Las plantas crecidas de esta forma sirvieron como fuente de semilleros cuándo estaban secas, como material para extraer DNA y para visualizar fenotipos en plántulas verdes y como plantas donadoras o receptoras de polen cuando se efectuó un cruzamiento dirigido en una fase del desarrollo de la planta tardía cuándo ya tenía las primeras silicuas.

### **3.- MÉTODOS DE TRANSFORMACION**

#### **3. 1.- Transformación de *Escherichia coli*.**

Para la complementación del mutante *wavy*, Las células competentes de *E. coli* se obtuvieron y transformaron según Inoue y col. (1990) (Inoue y col., 1990). Sin embargo, para generar las líneas de ARN de interferencia se siguieron los protocolos del proyecto AGRÍKOLA (Invitrogen). Las células se sembraron sobre placas de medio LB con el antibiótico de selección del plásmido.

#### **3. 2.- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.**

Para transformar *A. tumefaciens* se siguió el protocolo de Yanofsky y Nester (1986) para la complementación del mutante y del proyecto AGRÍKOLA (Invitrogen) para las líneas de ARN de interferencia para la *acina8* (Yanofsky y Nester, 1986). Las células se sembraron en placas de LB con rifampicina para seleccionar colonias de *Agrobacterium* y el/los antibiótico/s necesarios de selección para los plásmidos transformados.

#### **3. 3.- Transformación de *Arabidopsis thaliana*.**

Las plantas de *Arabidopsis* se transformaron con la cepa de *A.tumefaciens* portadora del plásmido con el ADN que se quería introducir en el genoma de la planta siguiendo el método de Bechtold y col. (1998) (Bechtold y Pelletier, 1998).

#### **4.- TECNOLOGÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Los protocolos descritos por Sambrook y col. (1989) han sido empleados de forma mayoritaria para el tratamiento de extracción y análisis de las muestras de ADN, excepto cuando se han utilizado preparados o reactivos comerciales, en los que se ha seguido el protocolo especificado por el fabricante.

##### **4. 1.- Aislamiento y purificación de ADN.**

El ADN plasmídico de las bacterias se obtuvo con Qiaprep Spin Miniprep Kit o bien con Qiaprep HiSpeed Midi Kit en el caso de cultivos más voluminosos, ambos de Qiagen.

Para purificar fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción, fragmentos de PCR para secuenciar o fragmentos extraídos de geles de agarosa se empleó el kit de purificación de Qiagen QiaQuick.

La extracción de ADN genómico de planta se realizó siguiendo el método de Dellaporta y col. (1983) (Dellaporta S. L., 1983) modificado en algunos puntos. La recogida del material vegetal se efectuó con hojas de roseta o caulinares en tubos eppendorf de 1,5 ml que contenían 5 ó 6 bolas de vidrio de entre 450 y 600 mm de diámetro. El material fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado en un ultracongelador de -80°C para su posterior trituración en un agitador de vaivén con una capacidad para 48 tubos durante un minuto y medio a máxima potencia. Se añadieron 300ml del buffer de extracción y se volvió a triturar, se adicionaron entonces 400ml del buffer de lisis y 75 ml del detergente sarcosil, se voltearon las muestras para mezclarlas bien y se incubaron media hora a 65°C. A continuación, se añadió un volumen de cloroformo isoamílico (24:1) (Merck) y se centrifugó a 13.000 r.p.m. 15 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante en otro tubo y se precipitó con 800 ml de isopropanol enfriado a -20°C, se centrifugaron otros 15 minutos a 13.000 r.p.m. y 4°C y se lavó el sedimento con 600 ml de etanol al 70%. Cuando todo el etanol se había evaporado, se diluyó el ADN en agua miliQ estéril con RNAsa (10 mg/ml).

#### **4. 2.- Amplificación de fragmentos de ADN**

Los fragmentos de ADN se amplificaron según la técnica de la reacción en cadena de la ADN polimerasa descrita por Mullis (1986) (Mullis y col., 1986), mediante el uso de cebadores específicos (Bonsái, Roche, Sigma-Genosys e Invitrogen) a una concentración de 200nm y específicos de las regiones que se querían amplificar en cada caso.

La polimerasa Taq de Amersham fue la utilizada en la mayoría de las ocasiones. En primer lugar se empleó para realizar la PCR (polimerase chain reaction) de los marcadores moleculares en el paseo cromosómico de los mutantes de EMS; para comprobar clones de bacterias haciendo la PCR directamente sobre la colonia o sobre el cultivo líquido; para comprobar ADN genómico de *Arabidopsis* y, por último, para elaborar sondas utilizadas en los ensayos tipo northern o southern. Cuando el objetivo era secuenciar o clonar un fragmento de pcr se emplearon las polimerasas Pwo o Expand High Fidelity de Roche y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los desoxinucleótidos (Roche) se utilizaron a una concentración de 0,2mM en la mezcla de reacción y el tampón de PCR se preparó siguiendo los protocolos de Sambrook y col. (1989).

Las máquinas de PCR empleadas pertenecen a los modelos PTC-100 (Peltier Termal Cyler) de MJ Research y Gene Amp PCR System 2700 de Applied Biosystem. Se utilizó un programa estándar de amplificación modificando únicamente la temperatura de unión de los oligos y los tiempos de extensión en función del tamaño de los fragmentos esperados.

#### **4. 3.- Técnicas electroforéticas.**

Para las electroforesis de ADN se usaron rutinariamente geles de agarosa (Pronadisa) al 1% en tampón TAE 1x teñidos con BrEt (Sigma). El tampón de carga fue glicerol al 5% teñido con azul de bromofenol y xilenocianol (ambos de Sigma) y el tampón de corrida fue TAE 1x. La diferencia de potencial fue de 100 a 150 V. Las

bandas se revelaron mediante exposición a luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc (BioRad). En caso de ser geles para separar fragmentos de SSLP se usó agarosa de alta resolución (Biotools) al 5% y una diferencia de potencial de 150 V.

Para comprobar el tamaño de los fragmentos se recurrió al uso de los marcadores moleculares  $\lambda$ Eco/Hind (Roche) para los fragmentos mayores de 1 Kb y low leader (Invitrogen) para los menores.

#### **4.4.- Aislamiento y purificación de ARN de plantas.**

El ARN se extrajo mediante el método RNAwiz (Ambion) y los ARNs resultantes se igualaron con la ayuda de un nanodrop (marca).

#### **4.5.- Electroforesis de ARN: Ensayo tipo northern.**

Los geles para los ensayos tipo northern se realizaron según Sambrook y col., 1989. Como tampón de electroforesis se utilizó MOPS1X. La mezcla de carga consistió en MOPS1X, formamida al 50%, formaldehído al 5,9%, azul de bromofenol 0.4 mg/mL y EtBr 1 mg/mL. Posteriormente, el ARN se transfirió a filtros de nylon mediante capilaridad. En cada caso se cargaron entre 10-15  $\mu$ g de ARN por muestra.

Los fragmentos de ADN que se emplearon como sondas se marcaron radiactivamente con 50  $\mu$ Ci de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  cada una, utilizando el kit Rediprime<sup>TM</sup>II Random Primed DNA Labelling de Amersham. Posteriormente, las sondas se purificaron en columnas MicroSpin S-200 HR de Amersham. La hibridación se realizó según Church y Gilbert (1984) (Church y Gilbert, 1984) a 65°C en todos los casos. Los lavados tras la hibridación se realizaron a 65°C con las soluciones 2x SSC, 1% SDS y 1x SSC, 1%SDS. La deshibridación de los filtros se hizo en una solución de SDS al 0.5% hirviendo hasta alcanzar la temperatura ambiente.

## **5.- TECNOLOGÍA DE PROTEÍNAS**

### **5.1.- Aislamiento y purificación de proteínas**

Para proceder a la extracción de las proteínas totales, se recogieron las plántulas de 7 días y se trituraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo de 50 µg aproximadamente. A continuación se le añadió a cada muestra 100 µl del tampón de ruptura (6M de Urea, 2% SDS, 125 mM HCl Tris pH 7.5, 5% de β-Mercaptoetanol y azul de bromofenol). Se mezcló el polvo y el tampón de ruptura en el vortex y se hirvieron las muestras durante 5 minutos. Se centrifugaron las muestras 15 minutos a máxima velocidad en frío y se valoró e igualó la cantidad de proteínas totales a 5µg/µl mediante el método colorimétrico de Bradford.

### **5.2.- Electroforesis de proteínas y ensayo tipo western**

Para realizar la electroforesis de proteínas se realizó un gel desnaturalizante de acrilamida: bisacrilamida al 10% de resolución (3.25 mL de Acrilamida: bisacrilamida, 3.75 mL de Tris-HCl 1M, 100 µl de SDS al 10%, 2.86 mL de agua MQ, 30 µl de APS al 25% y 6 µl de TEMED) y 4% de stacking (0.66 mL de Acrilamida: bisacrilamida, 0.66 mL de Tris-HCl 1M, 50 µl de SDS al 10%, 3.65 mL de agua MQ, 25 µl de APS al 25% y 2.5 µl de TEMED). Cuando el gel se solidificó se cargaron 50 µg de las muestras dejando libre el primer carril para 12 µl del marcador de peso molecular Novex Sharp Standard y se dejó correr el gel durante 3 horas a 100 voltios.

La transferencia a una membrana de PVDF se realizó con el sistema semidrytransfer (Amersham) durante 1 hora y media a 100 mA de corriente.

El ensayo tipo western se realizó bloqueando la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con TBS-1X, 5% leche y 0,1% de Tween20. La incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-actina de plantas Mab13a

(Sigma) se realizó con una dilución 1:1000 en TBS-1X durante 15 minutos. A continuación se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-1X, 0.1% Tween20 y 1% de leche. El anticuerpo secundario (ECL Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase-linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep) de Amersham) se diluyó 5000 veces en TBS-1X durante 1 hora y media y tras 3 lavados de 10 minutos con TBS-1X, 0.1% Tween20 y 1% de leche se procedió al revelado mediante el kit ECL-Advance™ Western Blotting Detection Kit de GE Healthcare de Amersham.

## **6.- CLONACIÓN POSICIONAL DE LOS MUTANTES SELECCIONADOS EN LA COLECCIÓN DE LEHLE**

Para localizar en el genoma de *Arabidopsis thaliana* los genes responsables de los fenotipos mutantes se utilizó la técnica del paseo cromosómico. Este proceso consiste en cruzar plantas mutantes de la variedad Col con otra variedad, en este caso con Ler, y así, seleccionar plantas con fenotipo mutante dentro de la F2. Estas plantas seleccionadas tendrán la mutación en algún punto de su genoma y en otra zona del mismo habrán recombinado con la variedad Ler. Amplificando regiones concretas del genoma de *Arabidopsis* con el uso de marcadores que diferencien ambas variedades, se pueden ir eliminando puntos, porque la aparición de una planta heterocigota u homocigota para Ler implica que ese marcador amplificado está aún lejos del punto de la mutación, ya que en el lugar de la mutación solo pueden aparecer plantas Col. Llega un momento en el que no se puede avanzar más porque todos los ADN de las plantas son Col pero la región es tan amplia que incluye muchos genes, entonces hay que realizar una nueva extracción de ADN para ver si se puede localizar de forma más concisa la zona de la mutación. Al final se hace necesaria la secuenciación de varios genes hasta llegar a encontrar el mutado. Para el cartografiado del gen alterado en el mutante *raw3* se realizaron además cruzamientos con plantas de los ecotipos Cvi y Ws de *Arabidopsis*.

Los marcadores moleculares (CAPs y SSLPs) se diseñaron según los datos recogidos en la base de datos de polimorfismos CEREON. En el caso de los mutantes *raw* el paseo cromosómico fue realizado por el Servicio de Cartografiado Genético de Mutantes del proyecto GEFA.

Los marcadores se probaron en plantas con fenotipo mutante de poblaciones F2 segregantes para el caso de los mutantes *wavy* y *raw2*, mientras que el caso de *raw3* hubo que llegar a la F3 ya que en la F2 no fuimos capaces de detectar el fenotipo mutante.

En la tabla 1 se muestran los oligos empleados para secuenciar el gen que codifica para la proteína actina2 en el mutante *wavy*.

| NOMBRES            | OLIGOS DE SECUENCIACIÓN          | TAMAÑO (Pbs) | Tm (°) |
|--------------------|----------------------------------|--------------|--------|
| <b>Actina2.1F-</b> | 5'GAA TCT GAA CAC TGT CAA TG 3'  | 20           | 56     |
| <b>Actina2.1R-</b> | 5'GAT AAT CAG AGC TCA GTT C 3'   | 19           | 54     |
| <b>Actina2.2F-</b> | 5'CGG TTA GTA CAT TTT AGG C 3'   | 19           | 54     |
| <b>Actina2.2R-</b> | 5'GAG TTT GTC ACA CAC AAG TGC 3' | 21           | 58     |

Tabla1. Oligos empleados en la secuenciación del gen que codifica para la proteína actina2 en el mutante *wavy*.

## 7.- COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN *wavy*

Se realizó introduciendo el vector 27pAA2 (Ringli y col., 2002), portador del promotor de la actina2 fusionado al cADN del mismo gen en las plantas mutantes.

## 8.- ENSAYO HISTOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GLUCURONIDASA (GUS)

El ensayo de actividad  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) se hizo en base a Jefferson y col. (1987). En ambos casos se utilizaron alvéolos de 1 ó 3 ml (Nunclon) con 1 ml de solución de X-Gluc (Glycosynth) y se incubaron a 37 °C durante la noche.



## **9.- TÉCNICAS MICROSCÓPICAS**

### **9.1.- Preparación de muestras para microscopía óptica.**

Los cortes transversales histológicos de las raíces teñidos con azul de toluidina fueron realizados por la doctora Preetie Dahiya del laboratorio de Keith Roberts (Jhoniness).

Las inclusiones en parafina de hipocotilos de *Arabidopsis* se realizaron siguiendo los protocolos del Departamento de Genética del centro John Innes de Norwich.

### **9.2.- Preparación de muestras para microscopía confocal.**

En el caso de aplicación de la fucsina básica se siguió el protocolo de Mahönen y col. (2000) (Mahonen y col., 2000).

Las líneas de proteína verde fluorescente (GFP) para la construcción PIN2-GFP (*wavy*) se obtuvieron mediante el cruce del mutante *wavy* con la línea PIN2 (Col) y seleccionando en la segregación F2 las plantas con fenotipo mutante y homocigotas para la construcción PIN-GFP.

### **9.3.- Preparación de muestras para microscopía de criobarrido.**

El material vegetal utilizado fueron plántulas de *A.thaliana* de un estadio de 7 días de crecimiento en cultivos “in vitro”. Se dejaron 4 días en soportes verticales de cristal y después la mitad placas se inclinaron en unos soportes metálicos dispuestos sobre los verticales, pero con una inclinación de 45°, para favorecer la respuesta tigmotrópica.

Antes de ser visualizadas en el microscopio de criobarrido, se colocaron en un portamuestras con el que se realizó el procesamiento de las muestras. Éste consistió en un enfriamiento brusco de la muestra en nitrógeno líquido, seguido de una

deshidratación por vacío y un recubrimiento de oro coloidal en su superficie para permitir la visualización por contraste.

## **10.- TRATAMIENTOS INFORMÁTICOS**

Las bases de datos empleadas para la búsqueda de información relacionadas con genes de *Arabidopsis* han sido NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MIPS (<http://mips.gsf.de>). Las secuencias de los genes se han editado en EditView y 4Peaks y las comparaciones se han realizado con BLAST (Altschul y col., 1997) en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en TAIR (<http://www.arabidopsis.org>).

La búsqueda bibliográfica se ha realizado en Pubmed dentro de la página de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en la biblioteca del Centro Nacional de Biotecnología y los artículos se han visualizado con Acrobat Reader y Vista Previa.

Las imágenes se han tratado con Adobe Photoshop. Las medidas de longitud de raíces, callos e hipocotilos se han efectuado utilizando como herramienta el programa ImageJ. Los datos se han analizado en Microsoft Excel para la elaboración de gráficos; esta tesis se ha escrito con el programa Microsoft Word y la presentación para la misma se ha preparado en Microsoft PowerPoint.

## **11.- FOTOGRAFÍA**

Las fotografías de raíces se hicieron con una cámara digital Canon DP50 montada sobre una lupa Leica, volteando la placa y con iluminación indirecta. Las imágenes restantes se obtuvieron en el Servicio de Fotografía del CNB. Las fotografías de criobarrido fueron tomadas en el Servicio de Microscopía del Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA) del CSIC. Las imágenes de fucsina básica, de yoduro de propidio y de GPF se realizaron en el Servicio de Microscopía Confocal del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) con un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200 acoplado al sistema de láseres Laser Scanning System Radiance 2100 de Biorad. Para la adquisición de imágenes se utilizó el software Lasersharp 2000 (v 4.3) de Biorad. Se usó el láser de excitación de He-Ne a 543 nm y el filtro de emisión E570LP.

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### 1.- IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES ALTERADOS EN EL DESARROLLO Y DISPOSICIÓN FUNCIONAL DE RAÍCES (AR)

Con el propósito de identificar y caracterizar mecanismos moleculares implicados en AR se llevó a cabo una selección de mutantes de *Arabidopsis* alterados en la disposición espacial del sistema radicular. Para ello fue necesario fijar previamente las condiciones del escrutinio. En la literatura y en experiencias previas del laboratorio hemos comprobado que el medio utilizado para crecer las plantas influye decisivamente en el patrón de crecimiento de raíces y por tanto en la intensidad del fenotipo. Así por ejemplo hemos observado un incremento en la intensidad de fenotipos de raíces mutantes en un medio pobre en nutrientes como el Johnson (Bates T.R. y Lynch, 1996) o en un medio MS con bajo contenido en nitrato (MSBN). De hecho estos medios se consideran que proporcionan unas condiciones más próximas a las que las plantas se encuentran en su medio natural potenciando un desarrollo radicular más “funcional”.



**Figura 5. Identificación de mutantes alterados en su arquitectura radicular.** La selección de mutantes se llevó a cabo en placas verticales con medio MSBN y 1 % de agar. Las semillas se colocaron con una distancia de 2 cm. entre ellas.

La identificación de mutantes se llevó a cabo utilizando una población mutagenizada por EMS de *Arabidopsis* del ecotipo Col. Las semillas se sembraron en placas cuadradas de 15 cm. con medio MSBN con 10 gr/l de Agar que proporciona al medio una dureza suficiente lo que permite disponer las placas verticalmente y así facilitar la visualización y el crecimiento de las raíces sobre la superficie del medio de cultivo. En estas placas se dispusieron 70 semillas por placa manteniendo entre ellas una distancia de 2 cm. intercalándolas de tal forma que se evitase el solapamiento de las raíces. Estas placas se colocaron verticalmente con el fin de observar el patrón de desarrollo radicular sobre la superficie del medio (Fig. 5).

La selección de plantas mutantes, se llevó a cabo en una población mutagenizada con EMS obtenida de la compañía LELHE ([www.arabidopsis.com](http://www.arabidopsis.com)). En esta colección se analizaron un total de 25.000 semillas de las que se seleccionaron 211 plantas como posibles mutantes alterados en la disposición de sus raíces. De éstas, en 106 se confirmó el fenotipo en la siguiente generación, identificándose 33 fenotipos diferentes de alteración en el patrón de desarrollo del sistema radicular (Tabla 2). Los fenotipos mutantes más destacados fueron la pérdida de la dominancia apical y alteraciones en la disposición y distribución de las raíces laterales y adventicias.

| <b>Escrutinio de mutantes alterados en arquitectura radicular</b> |        |
|---|--------|
| Plantas Analizadas  | 25.000 |
| Plantas Seleccionadas   | 211    |
| Plantas Reconfirmadas   | 106    |
| Fenotipos identificados   | 33     |

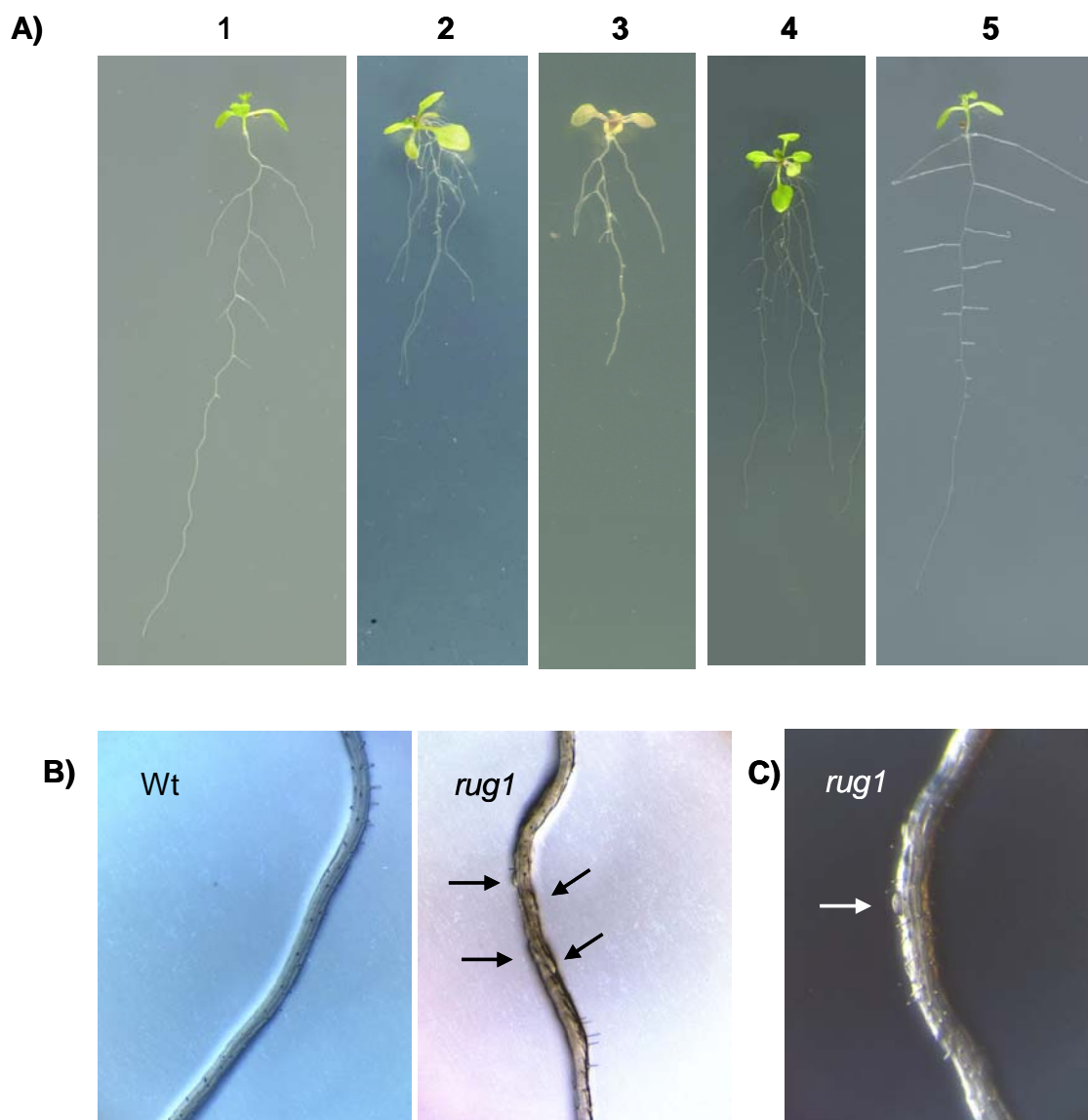
**Tabla 2.** Datos del escrutinio de mutantes alterados en arquitectura radicular.

Como se muestra en la tabla 3, se encontraron 11 mutantes que presentaban una clara pérdida de la dominancia apical. En tres de estos mutantes la disminución del crecimiento de la raíz principal es tan acusada que no permite el desarrollo de raíces laterales. Asimismo, se identificó un mutante que mostraba un fenotipo de crecimiento de raíces ondulado que denominamos *wavy*. El fenotipo de estos mutantes es muy similar al que muestran las plantas de *Arabidopsis* cuando crecen sobre una superficie inclinada que no pueden penetrar. Por tanto estos mutantes parecen mostrar un fenotipo de respuesta constitutiva a choque. Otro de los mutantes identificados presenta rugosidades en la epidermis de la raíz (*rug1*) y otros seis tienen afectados las raíces

laterales; 4 de ellos, en cuanto a la distribución de las mismas y los otros 2 en cuanto al ángulo de crecimiento. En la figura 6 se muestran algunos ejemplos de estos mutantes.

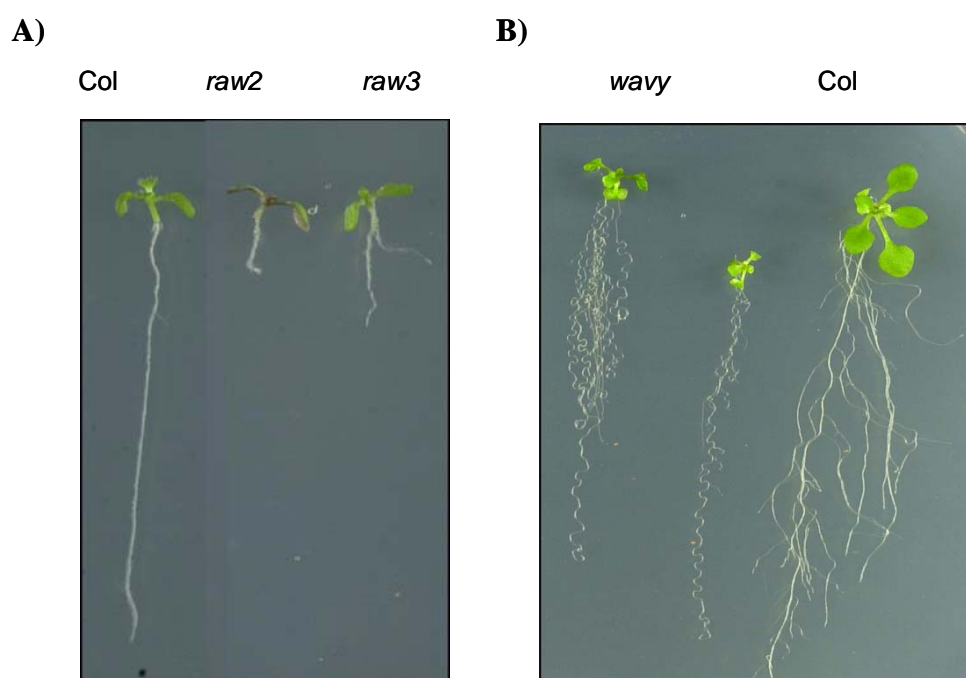
| Fenotipos Detectados                                       |    |
|--|----|
| Pérdida de dominancia apical                               | 11 |
| *Principal y laterales                                     | 3  |
| Activación de la respuesta de choque                       | 2  |
| Rugosidades en la raíz                                     | 1  |
| Alteración en la disposición de raíces laterales           | 4  |
| Alteración en el ángulo de crecimiento de raíces laterales | 2  |

**Tabla 3.** Fenotipos detectados



**Figura 6. Ejemplos de mutantes de raíz aislados en el escrutinio.** A) 1. Fenotipo de las plantas Col (Wt). 2. Mutante hiperfasciculado. 3. Mutante de raíz corta. 4. Mutante que presenta alteraciones en el número y localización de las raíces laterales. 5. Mutante con alteración en el ángulo de crecimiento de las raíces laterales. B) El mutante *rug1* presenta rugosidades en la raíz principal en los puntos de inicio de raíces laterales. C) Detalle de una rugosidad de la raíz de *rug1*.

De todos los mutantes identificados se escogieron tres con el fin de caracterizarlos en detalle. Dos de estos mutantes se seleccionaron en base a su fenotipo de raíz corta (Fig. 7A). Este fenotipo es similar al del mutante “*wooden leg*” (*wol*) clonado en el laboratorio del Prof Benfey (Mahonen y col., 2000). Por ello estos dos mutantes se denominaron *raw2* y *raw3* del inglés “*root as in wol*”. Nuestro interés por caracterizar estos nuevos mutantes *raw* estriba en que su clonación podría permitir la identificación de genes implicados en el control de la dominancia apical y por tanto de gran relevancia en AR. Como se ha mencionado antes el control de la dominancia apical es uno de los caracteres más importantes en AR ya que condiciona el desarrollo de los dos patrones de crecimiento más emblemáticos; el pivotante de dominancia apical preponderante y el fasciculado que se caracteriza por una pérdida de dominancia apical y por tanto de aspecto más “arbustivo”.



**Figura 7. Fenotipos de los mutantes *raw2*, *raw3*, *wavy* en medio MSBN vertical.** A) Fenotipo de raíz de los mutantes *raw2* y *raw3* (A) y *wavy* frente a su ecotipo silvestre Col.

El otro mutante seleccionado fue *wavy* que como mencionamos anteriormente muestra un fenotipo de torsión y curvatura de raíces similar al que muestran las raíces de *Arabidopsis* en respuesta al impedimento mecánico (Fig. 7B). La caracterización de este mutante podría tener aplicaciones prácticas ya que en muchos viveros las raíces de las plantas al tener que adaptar su crecimiento a los tiestos sufren fenómenos de torsión

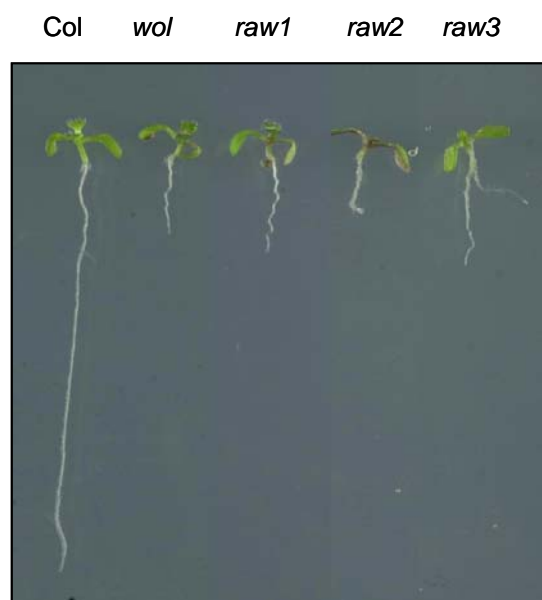
que conducen a un enrollamiento de su sistema radicular denominado espiralización que condiciona el desarrollo posterior de las raíces una vez transplantadas en el campo. Este fenómeno es especialmente importante en leñosas ya que el crecimiento radicular en espiral sigue sucediendo después de transferir el árbol al suelo lo que incide negativamente en la capacidad de anclaje del árbol.

El mutante *wavy* presenta un fenotipo de crecimiento ondulado del sistema radicular y por tanto de torsión constitutiva. La caracterización de este mutante puede permitir la identificación de genes implicados en procesos de espiralización de raíces así como de tropismos, tales como los movimientos de la raíz hacia nutrientes, gravitropismo, fototropismo o la capacidad de raíces para evitar obstáculos (tigmotropismo).

## 2.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE LOS MUTANTES

### 2.1.- Caracterización genética y fenotípica de los mutantes *raw2* y *raw3*

Los mutantes *raw* muestran un fenotipo de pérdida de dominancia apical de la raíz similar al descrito en el mutante *wol* (Fig. 8). El mutante *raw2* tiene disminuida la elongación de su raíz principal y no consigue desarrollar raíces laterales. De esta forma la supervivencia de la planta depende directamente de su capacidad para desarrollar raíces adventicias que se inducen en respuesta al estrés al carecer de una raíz funcional. En estadios posteriores la planta se desarrolla correctamente sin que tenga ningún otro fenotipo obvio en su parte aérea.



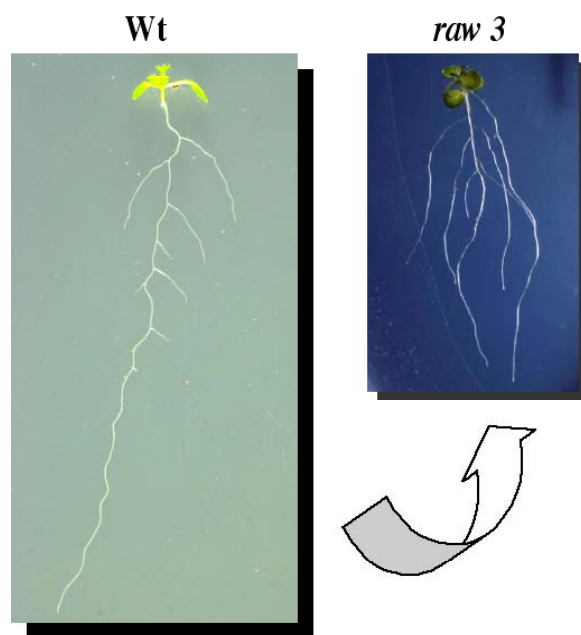
**Figura 8. Fenotipo de los mutantes de raíz corta *raw*.** Plantas de 7 días crecidas en medio MSBN.



Por el contrario, el mutante *raw3*, aunque presenta una pérdida notable de la dominancia apical, su raíz principal alcanza una mayor longitud que la del mutante *raw2* y a las dos semanas de crecimiento el mutante desarrolla raíces laterales que llegan a superar a la raíz principal. El resultado es un fenotipo hiperfasciculado como se muestra en la figura 9.

Con la finalidad de descartar que los mutantes *raw2* y *raw3* fuesen alelos de una misma mutación se realizó un test de alelismo que consistió en cruzar ambos mutantes entre sí y observar el fenotipo de las raíces de las plantas F1. El fenotipo de estas plantas resultó ser similar al de las plantas Col, lo que indica que *raw2* y *raw3* no son alelos de un mismo gen (Fig. 10). Además, para descartar que se tratase de nuevos alelos de *wol*, *raw2* y *raw3* se cruzaron por *wol* y se observaron las plantas F1 resultantes, que en los dos casos mostraron el fenotipo silvestre. Este hecho sugería que los genes mutados en *raw2* y *raw3* eran distintos a *wol*.

**Figura 9. Fenotipo hiperfasciculado del mutante *raw3*.** Plantas Columbia (wt) y *raw3* a las 3 semanas de crecimiento en un medio MSBN vertical. El mutante *raw3* muestra un fenotipo hiperfasciculado.



De todas formas como se conocía la existencia de complementaciones interalélicas entre alelos de *wol* (de Leon y col., 2004) se secuenció el gen *CRE1* responsable del fenotipo *wol* en ambos mutantes. La secuencia del gen *CRE1* indicó que en el fondo *raw2* y *raw3* este gen no mostraba ninguna mutación. Asimismo en la segregación F2 de cruzamientos de los mutantes *raw* con Col se observó que ambas mutaciones son recesivas y segregan como un gen único. Estos hechos junto con la

facilidad de diferenciar claramente el fenotipo mutante hacen que *raw2* y *raw3* sean los candidatos idóneos para ser identificados mediante paseo cromosómico.



**Figura 10. Test de alelismo.** Las plantas F1 del cruzamiento entre las plantas mutantes *raw2* y *raw3* son similares al ecotipo silvestre Col.

### 2.1.1.- Estudio de la sensibilidad a las hormonas citoquininas de los mutantes *raw2* y *raw3*

El gen *WOL* fue clonado en 1993 por el grupo del profesor Benfey (Mahonen y col., 2000). *WOL* codifica para un receptor quinasa de histidinas. Posteriormente el grupo de Inoue y col en 2001 identificó un mutante insensible a CQs mediante un escrutinio en callos de hipocotilos de *Arabidopsis*. La clonación posicional de este mutante permitió comprobar que se trataba de un alelo del gen *WOL*, es decir el receptor *WOL* era en realidad el primer receptor de CQs clonado hasta la fecha por lo que se denominó CITOKININ RECEPTOR 1 (CRE1). El fenotipo de raíz corta exhibido por *raw2* y *raw3* es muy similar al fenotipo de *wol*. Por ello decidimos determinar si estos mutantes eran al igual que *wol* insensibles CQs. Para ello, se generaron callos de raíz y de hipocotilo de los mutantes *raw2* y *raw3*. En este experimento las plantas insensibles a CQs desarrollan callos pequeños y amarillentos en presencia de unas concentraciones de AUXs y CQs en las que las plantas silvestres desarrollan callos verdes y grandes. Como se observa en la figura 11A en condiciones de 60  $\mu$ M de kinetina y a 100  $\mu$ M de 2,4-D al cabo de 4 semanas, los callos de las plantas Col eran verdes y grandes. Sin embargo

los de los mutantes eran amarillentos y pequeños tanto los obtenidos a partir de raíces como los de hipocotilo incluso mas pequeños que los obtenidos con el mutante *wol* (Fig. 11A). Estos resultados indican que los mutantes *raw* son insensibles a CQs. La insensibilidad observada en los mutantes *raw* y el hecho de ser mutaciones distintas a *wol* hace que la identificación de los genes *RAW* sea especialmente interesante.

Otra forma de determinar la sensibilidad a CQs de los mutantes fue estudiar la disminución de crecimiento de la raíz que se produce en respuesta a la hormona. A pesar de tratarse de mutantes de raíz corta en presencia de 1  $\mu$ M de kinetina fuimos capaces de determinar en los mutantes *raw* el porcentaje de reducción de la elongación de la raíz en respuesta a la hormona. Como se observa en la figura 11B el mutante *raw3* es el más insensible a kinetina puesto que no muestra una disminución en el porcentaje de crecimiento si se comparan las plantas crecidas con o sin hormona. El mutante *raw2* también muestra una reducción del crecimiento muy baja, tan solo de un 10% mientras que las plantas silvestres mostraron una reducción de la elongación del 40% en respuesta a la hormona. Los alelos de *CRE1 wol* y *raw1* disponibles en el laboratorio se utilizaron como controles en este ensayo mostrando una reducción del crecimiento de un 30 y un 20 % respectivamente. Estos datos confirman que los mutantes *raw2* y *raw3* son insensibles a la hormona kinetina y que esta insensibilidad es incluso más acusada que la observada para los mutantes insensibles a CQs previamente descritos *wol* y *raw1*.

### 2.1.2.- Estudio del desarrollo del tejido vascular en los mutantes *raw2* y *raw3*

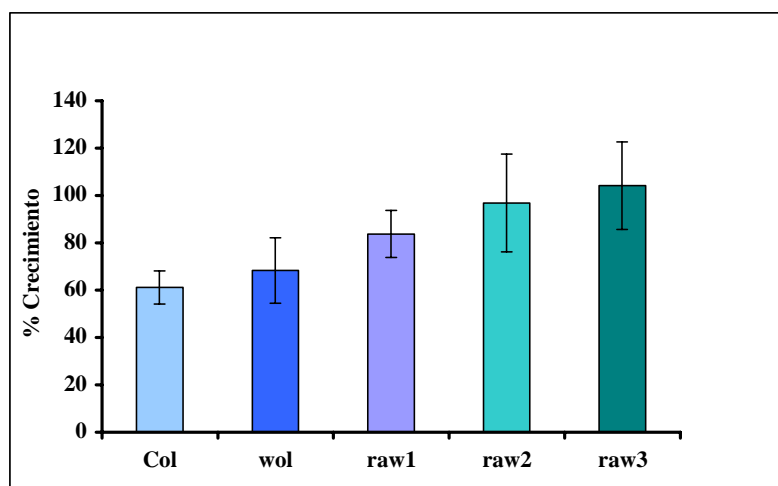
El fenotipo más característico del mutante *wol* es un defecto en el número de células precursoras del tejido vascular que se generan durante el desarrollo del embrión. Este defecto hace que el mutante dedique todas sus células iniciales en la formación de xilema y por tanto la raíz deja de ser funcional al no desarrollar tejido floemático (Mahonen y col., 2000). Como los mutantes *raw2* y *raw3* presentan fenotipos similares al de *wol* además de su insensibilidad a CQs decidimos estudiar el patrón de desarrollo vascular de estos mutantes con la finalidad de conocer si los genes alterados en *raw2* y *raw3* presentan alteraciones en el desarrollo del tejido vascular. Para ello, realizamos una tinción con fucsina básica en plántulas de siete días de crecimiento de los mutantes *raw2* y *raw3* utilizando como controles nuevamente plantas del ecotipo Col y los mutantes *raw1* y *wol*. La tinción se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mahönen

y col. en el 2000 que permite la visualización de los haces vasculares de las raíces en disposición longitudinal mediante microscopía confocal. El resultado de este experimento indicó que mientras que el mutante *raw3* no muestra ninguna alteración aparente en la disposición de sus haces vasculares en comparación con el silvestre; *raw2* es incapaz de desarrollar un metaxilema maduro lo que se observa por el patrón reticulado de la tinción con fucsina. (Fig. 12A).

A)



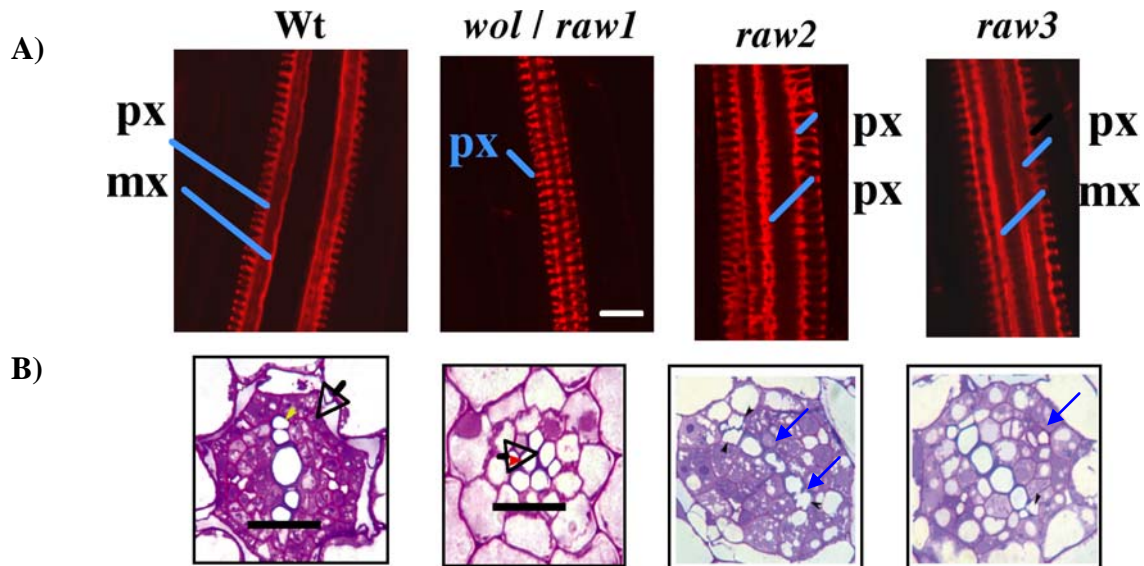
B)



**Figura 11. Sensibilidad a citoquininas de los mutantes *raw*.** A) Callos de hipocotilo de 6 semanas de crecimiento obtenidos con 100 ng/ml de 2,4 D y 60 ng/ml de kinetina. B) % crecimiento de los mutantes a los 7 días en medio MSBN en presencia de 1  $\mu$ M de la hormona kinetina.

Con el propósito de caracterizar más en detalle la estructura del tejido vascular en los mutantes *raw2* y *raw3* se realizó un análisis histológico mediante cortes transversales de raíces que se tiñeron con azul de toluidina para marcar las paredes de las células lo que permite visualizar más en detalle la estructura de la raíz.

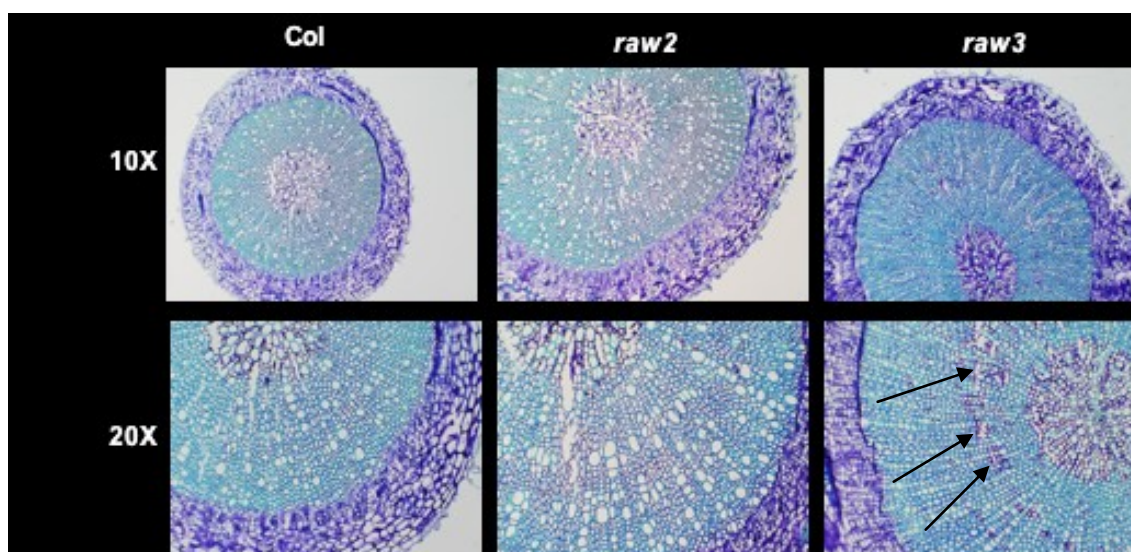
El mutante *raw2* presentó un patrón reticulado similar al que se había observado con la tinción con fucsina básica, lo que indica que este mutante tiene alterada la maduración de los vasos xilemáticos (Fig. 12B).



**Figura 12. Estudio del desarrollo de tejido vascular en los mutantes *raw*.** A) Tinción con fucsina básica en raíces de 7 días. B) Cortes histológicos de las raíces de las plantas de *Arabidopsis* de 7 días teñidos con azul de toluidina. Las flechas negras indican las células encargadas de desarrollar el xilema en las plantas Wt e incapaces de formarlo en el mutante *raw1* y las flechas azules indican en *raw2* las células incapaces de desarrollar metaxilema maduro y en *raw3* las células parenquimáticas engrosadas en lignina.

El mutante *raw3*, por el contrario, no mostró alteraciones en el desarrollo de xilema ni del floema. Sin embargo en las células parenquimáticas se observan paredes engrosadas y lignificadas (teñidas de morado) lo que podría indicar que el mutante *raw3* tiene alterada el patrón de especificidad tisular para la formación y maduración de los haces xilemáticos. Esta observación indica que el mutante *raw3* muestra engrosamiento de la pared celular en células que inicialmente no están programadas para ello. El engrosamiento de la pared celular en células parenquimáticas puede influir decisivamente en los procesos de vascularización secundaria. A pesar de que *Arabidopsis* no desarrolla *per se* vascularización secundaria es posible inducirla en determinadas condiciones de crecimiento (Chaffey y col., 2002). Para ello las plantas se crecen en luz continua para acelerar su crecimiento hasta que los tallos florales comienzan a elongar. En ese momento los tallos de las inflorescencias se van cortando durante dos meses según van apareciendo lo que provoca un engrosamiento del tallo y por tanto una vascularización secundaria inducida en respuesta a este proceso. De esta forma se consigue generar tallos muy lignificados que se pueden observar mediante

cortes histológicos transversales y posterior tinción con azul de toluidina que tiñe las paredes de las células lignificadas de color morado.



**Figura 13. Hipocotilos de plantas con vascularización secundaria inducida.** Cortes histológicos de hipocotilos de *Arabidopsis* de 8 semanas teñidos con azul de toluidina. Las flechas negras localizan las células parenquimáticas engrosadas con lignina en el corte transversal del hipocotilo del mutante *raw3*.

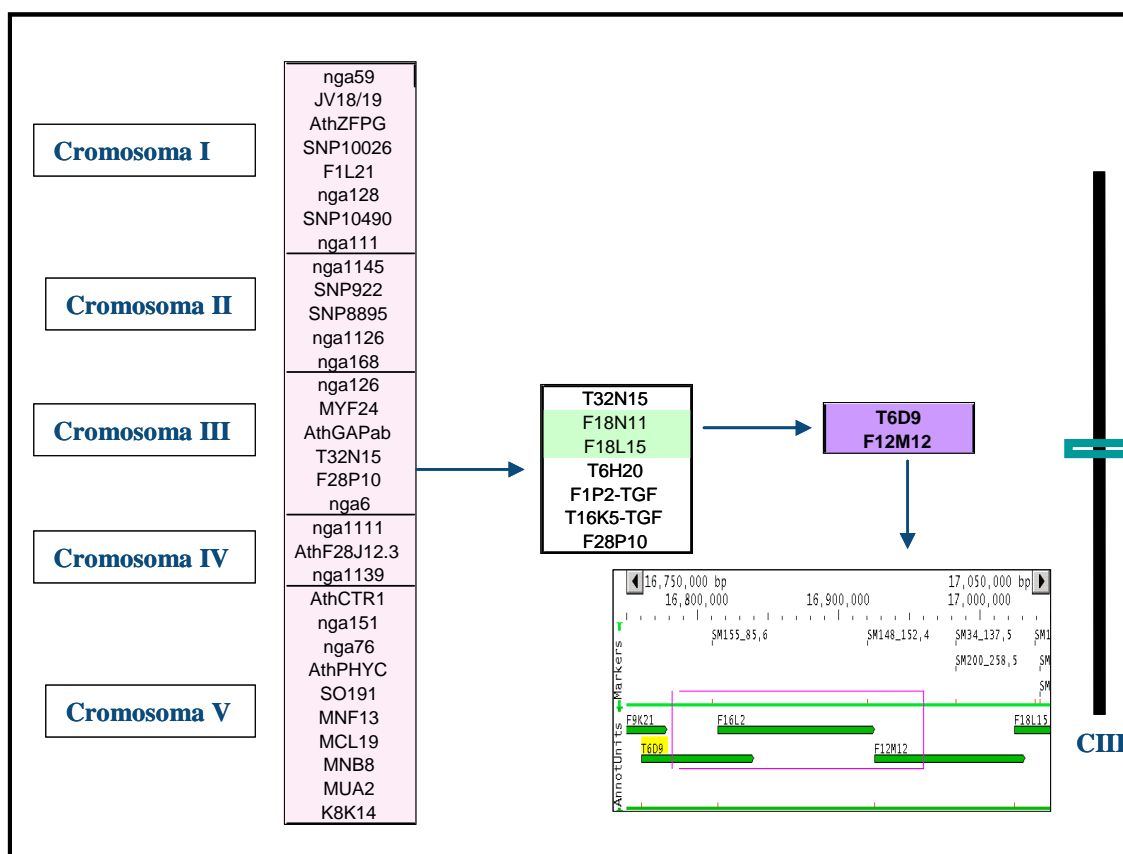
Como se observa en la figura 13 el mutante *raw2* muestra un patrón de vascularización secundaria similar al de las plantas silvestres. Sin embargo, el mutante *raw3* muestra células corticales lignificadas, de acuerdo a lo observado en cortes transversales de raíz. Por tanto *raw2* y *raw3* son dos nuevos mutantes insensibles a CQs que muestran alteraciones en el desarrollo y diferenciación del tejido vascular.

### 2.1.3.- Cartografiado genético de los mutantes *raw2* y *raw3*

Con el fin de identificar los genes *RAW* se procedió a su cartografiado molecular analizando plantas seleccionadas por su fenotipo mutante de raíz corta en una población F2 de un cruzamiento entre los mutantes (en fondo Col), y el ecotipo Ler.

En el caso del mutante *raw2* en las plantas seleccionadas se extrajo el ADN y se procedió a su análisis con el uso de marcadores moleculares de tipo SSLP. En total se analizaron 500 plantas homocigotas para la mutación *raw2* en donde se probaron marcadores de los 5 cromosomas de *Arabidopsis* que permitieron establecer una zona de ligamiento entre los BAC F18N11 y F18L15 del cromosoma III. Un análisis más

exhaustivo utilizando marcadores específicos de esa zona permitió acotar la región que contiene el gen mutado entre los BAC T6D9 y F12M12 que comprende 160 Kb y que engloba 41 genes. Entre estos genes no se ha hallado ninguno de los conocidos de la ruta de señalización de las CQs, ni tampoco en el desarrollo del tejido vascular, con lo que el gen *raw2* es un gen nuevo implicado en la correcta maduración de los vasos xilemáticos y en la sensibilidad a CQs (Fig. 14).

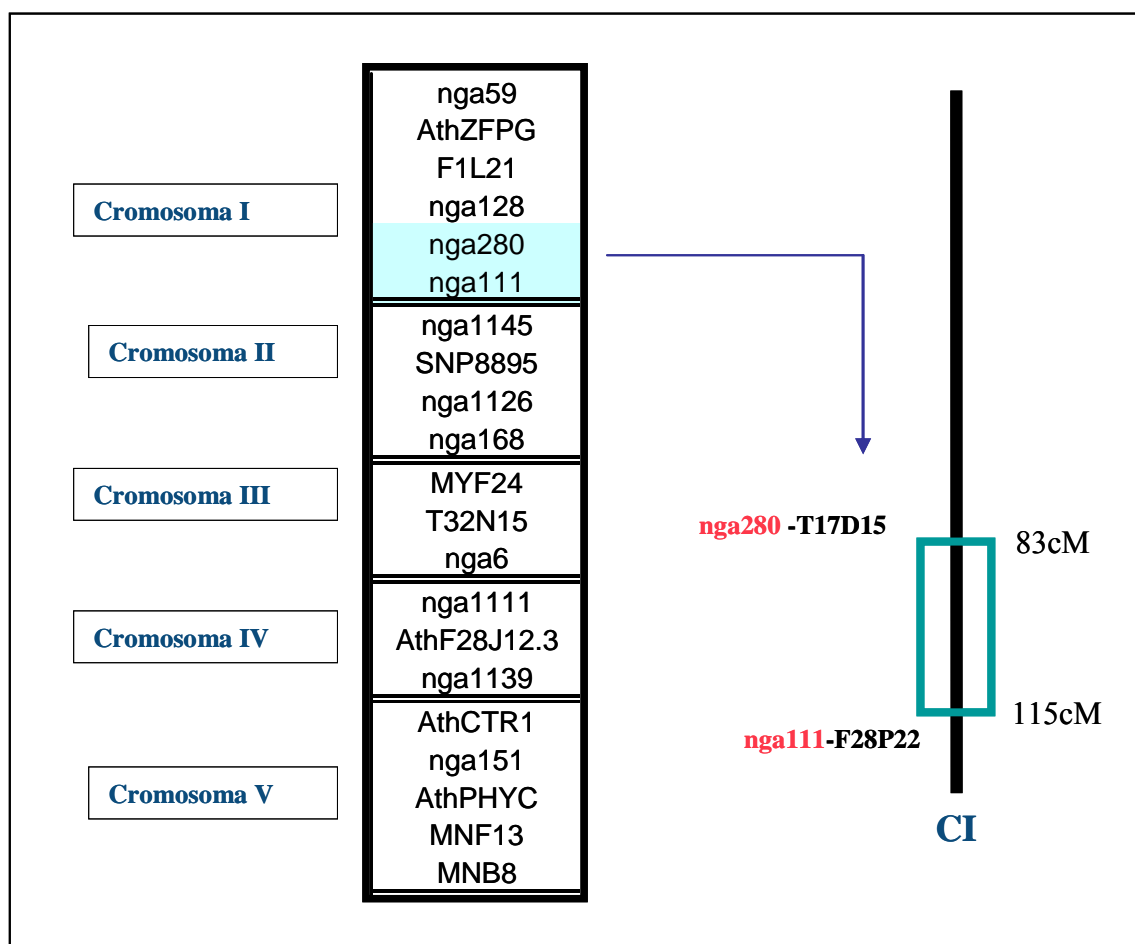


**Figura 14. Localización cromosómica del gen *raw2*.** A la izquierda se muestran los marcadores moleculares de tipo SSLP empleados para el análisis de las plantas mutantes seleccionadas en una F2 de un cruzamiento del mutante por Ler. Una primera aproximación acotó la mutación entre los BAC F18N11 y F18L15 del cromosoma III y un análisis posterior fijó el punto de la mutación en 41 genes entre los BACs T6D9 y F12M12.

El cartografiado de la mutación *raw3* presentó algunos problemas iniciales. La población F2 del cruzamiento del mutante con el ecotipo Ler no segregó ningún fenotipo mutante. Dado que previamente habíamos determinado que el fenotipo segregaba como un gen único, la ausencia de fenotipo en la F2 del cruzamiento con Ler puede ser debida a la presencia de un modificador o varios modificadores en el ecotipo Ler que enmascara el fenotipo. Con el fin de identificar líneas que hayan perdido este modificador o modificadores se analizaron la segregación del fenotipo mutante en 70



familias F3 lo que permitió identificar 15 poblaciones que segregaban correctamente el fenotipo mutante. El análisis con marcadores de estas 15 familias permitió ligar la mutación *raw3* en dos regiones. La primera de ellas se correspondía con una zona del cromosoma I situada entre los marcadores nga 126 y AtGAPAB y la segunda con la región del cromosoma III comprendida entre los BAC T17D15 y F28P22. Al mismo tiempo se realizaron cruzamientos del mutante *raw3* con plantas de los ecotipos Ws y Cvi. En este caso las poblaciones F2 segregaron correctamente el fenotipo mutante. El análisis de la F2 del cruzamiento con Cvi permitió discriminar entre las dos regiones delimitadas previamente. De este modo se comprobó que la región que contenía el gen *RAW3* se localiza en una zona de 32 cM comprendida entre los BAC T17D15 y F28P22 del cromosoma I (Fig. 15).



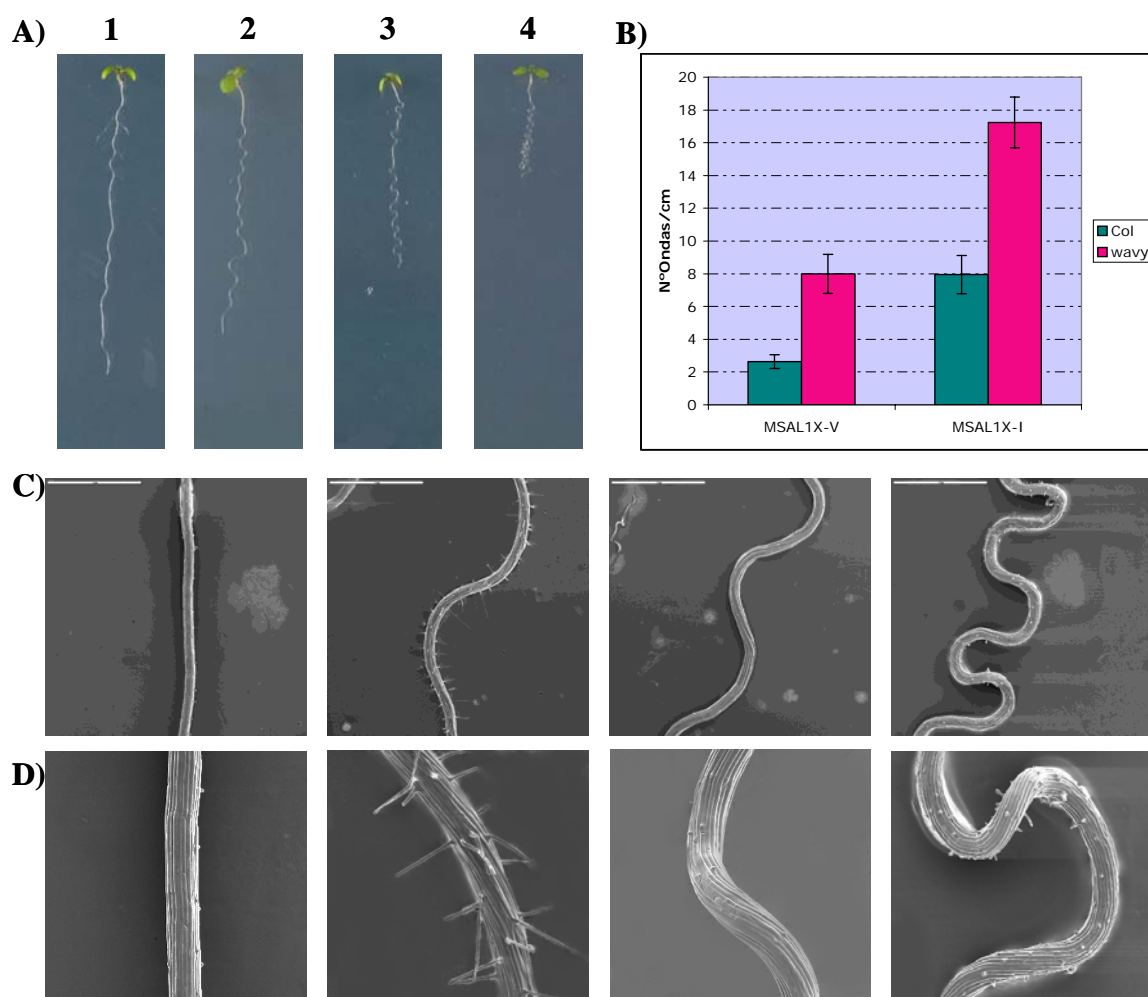
**Figura 15. Localización cromosómica del gen *raw3*.** A la izquierda se muestran los marcadores moleculares de tipo SSLP empleados para el análisis de las plantas mutantes *raw3* seleccionadas en las F2 de los cruzamientos del mutante con Cvi, Ws y Ler. Una primera aproximación acotó la mutación entre los BAC T17D15 y F28P22 del cromosoma I en una región de 32 cM.



## 2.3.-Caracterización genética y fenotípica del mutante *wavy*

### 2.3.1.- Fenotipo del mutante *wavy*

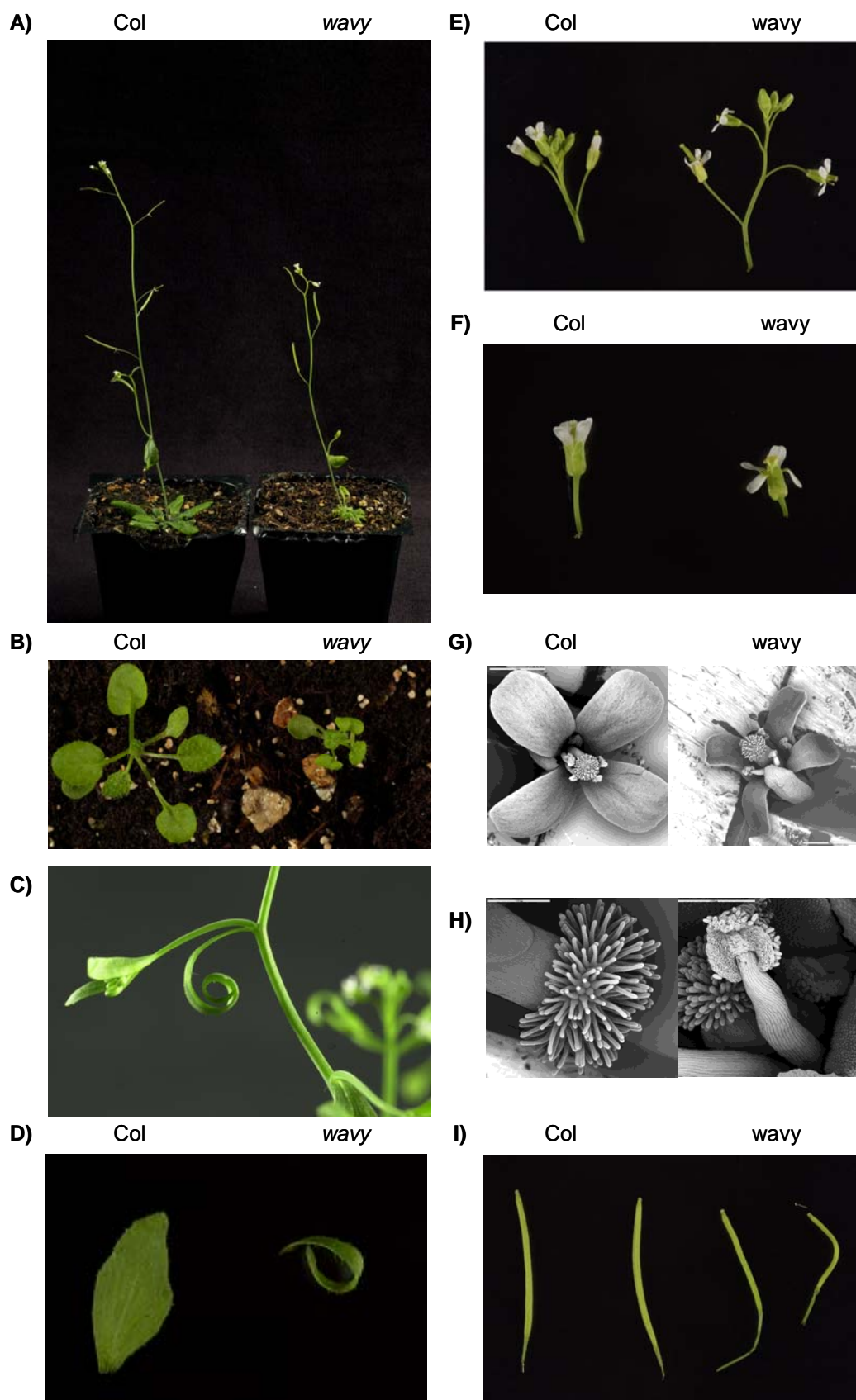
El mutante *wavy* exhibe fenómenos de torsión y curvatura en toda la planta. Asimismo su sistema radicular presenta un fenotipo de torsión en forma de ondas simétricas. Este patrón de crecimiento es idéntico al que se observa en la raíz de Col cuando se crecen las plantas en placas inclinadas sobre un agar muy concentrado e impenetrable por la raíz. En estas condiciones se considera que el crecimiento radicular esta sometido a un choque constante y por tanto con la respuesta a tigmogénesis activa. Por ello el fenotipo que muestra el mutante *wavy* en placas verticales se podría considerar como de respuesta constitutiva al choque. Sin embargo, cuando *wavy* se crece en placas inclinadas, el fenotipo se ve exacerbado (Fig. 16A).



**Figura 16. Fenotipo constitutivo de respuesta de choque activada en el mutante *wavy*.** A) Plantas crecidas de Col (1 y 2) y *wavy* (3 y 4) crecidas en placas verticales (1 y 3) o inclinadas 45° (2 y 4) de medio MBSN. B) Representación gráfica del número de ondas por centímetro de medio colonizado por la raíz de las plantas Col y *wavy* en placas verticales e inclinadas. C) Fotografías de las raíces tomadas en el microscopio de criobarrido a 33 aumentos. D) Imágenes de criobarrido que muestran los detalles de las torsiones.

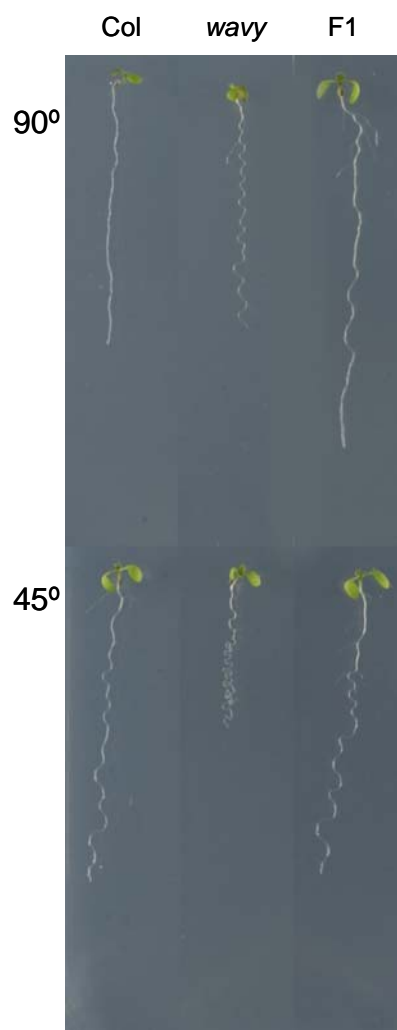
Las fotos de microscopía de criobarrido de la figura 16C y 16D reflejan la torsión que experimentan las raíces cuando se someten al choque. Esta torsión es más pronunciada en el mutante *wavy*, pero sin embargo cuando se cuantifica el número de ondas por centímetro de placa colonizada por la raíz, se observó que las plantas *wavy* crecidas en placas verticales son similares al de las plantas Col crecidas en placas inclinadas (Fig. 16B). Este resultado indica que la intensidad de las torsiones es mayor en el mutante, pero el número de ondas es similar al que producen las raíces de Col crecidas en placas inclinadas. Esta observación también comprende a las raíces secundarias y a las adventicias. La observación macroscópica de la raíz nos permitió determinar que el mutante *wavy* es incapaz de elongar pelos radiculares (Fig. 16D). La cuantificación del número de ondas nos permitió determinar que cuando las raíces de plantas silvestres se crecen en placas inclinadas (sometidas a choque), se incrementa el número de ondas mas de 2,5 veces alcanzando unos niveles similares a los del mutante. Por tanto, debido a que las plantas *wavy* mimetizan la respuesta de choque, este fenotipo podría considerarse como constitutivo de tigmogénesis. Sin embargo el mutante *wavy* crecido en placas inclinadas incrementa dos veces mas el número de ondas que producen las plantas Col crecidas en las mismas condiciones mostrando así un fenotipo de hipersensibilidad al choque. Las fotos de criobarrido muestran en estas condiciones una curvatura exagerada de la raíz principal en el mutante (Fig. 16C y 16D).

El fenotipo del mutante *wavy* no es exclusivo de raíz y presenta otras alteraciones en la parte aérea (Fig. 17). Las hojas de la roseta aparecen enrolladas por el envés y son más pequeñas que las de las plantas silvestres (Fig. 17B y 17D). Las hojas caulinares también se retuercen sobre si mismas dando aspecto de zarcillo (Fig. 17A y 17C) y los tallos desarrollan curvaturas y crecen de manera similar a los de las plantas trepadoras (Fig. 17A). Las flores giran sobre su pedúnculo y tanto los sépalos como los pétalos permanecen abiertos permitiendo visualizar los estambres, cuyos filamentos se doblan y retuercen hacia los pétalos (Fig. 17E, 17F y 17G). El estigma del pistilo se desarrolla de una manera semejante al de las plantas silvestres (Fig. 17H). Las silicuas son pequeñas y se doblan en torno al tallo, rodeándolo (Fig. 17I). Las semillas del mutante son también mas pequeñas aunque perfectamente viables, las hojas tienen un aspecto clorótico y el tiempo de floración es menor. Por tanto, el mutante *wavy* en parte aérea muestra un fenotipo aleatorio y constitutivo de torsiones y curvaturas en diferentes órganos de la planta.



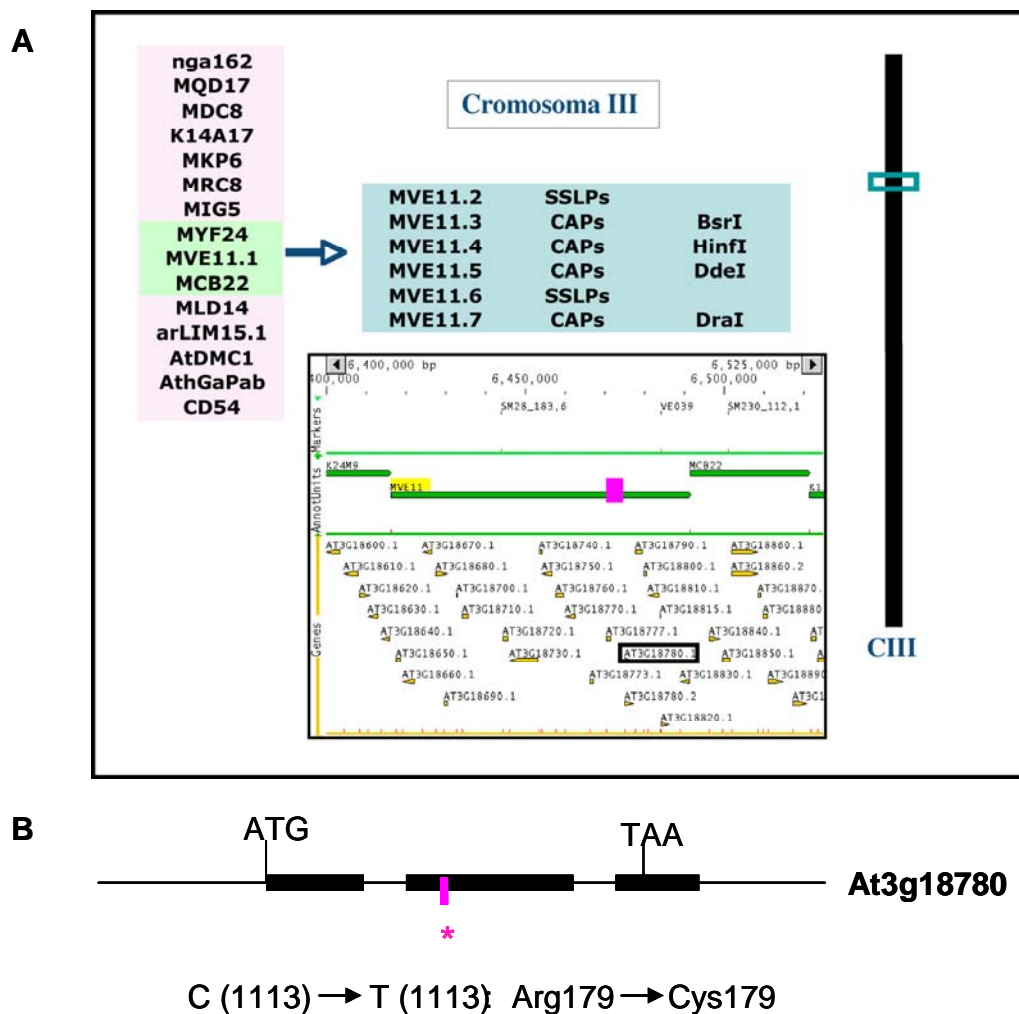
**Figura 17. Fenotipo de la parte aérea del mutante *wavy*.** A) Fenotipo del mutante *wavy* (dcha.) junto al de su ecotipo silvestre *Col* (izda). B) Fenotipo de la roseta basal y C) y D) Detalle de las hojas caulinares del mutante. E) Fenotipo de los verticilos florales, F) y G) Fenotipo de las flores H) Fotografías de microscopía de criobarrido de un pistilo (izda.) y de un estambre mutantes (dcha.). I) Fenotipo de las silículas.

**Figura 18. Fenotipo de plantas WAVY/wavy.** Fenotipo de plantas crecidas durante siete días del heterocigoto WAVY/wavy y sus parentales respectivos crecidos en placas verticales e inclinadas 45° de medio MSBN.



### 2.3.2.- Cartografiado genético de la mutación *wavy*

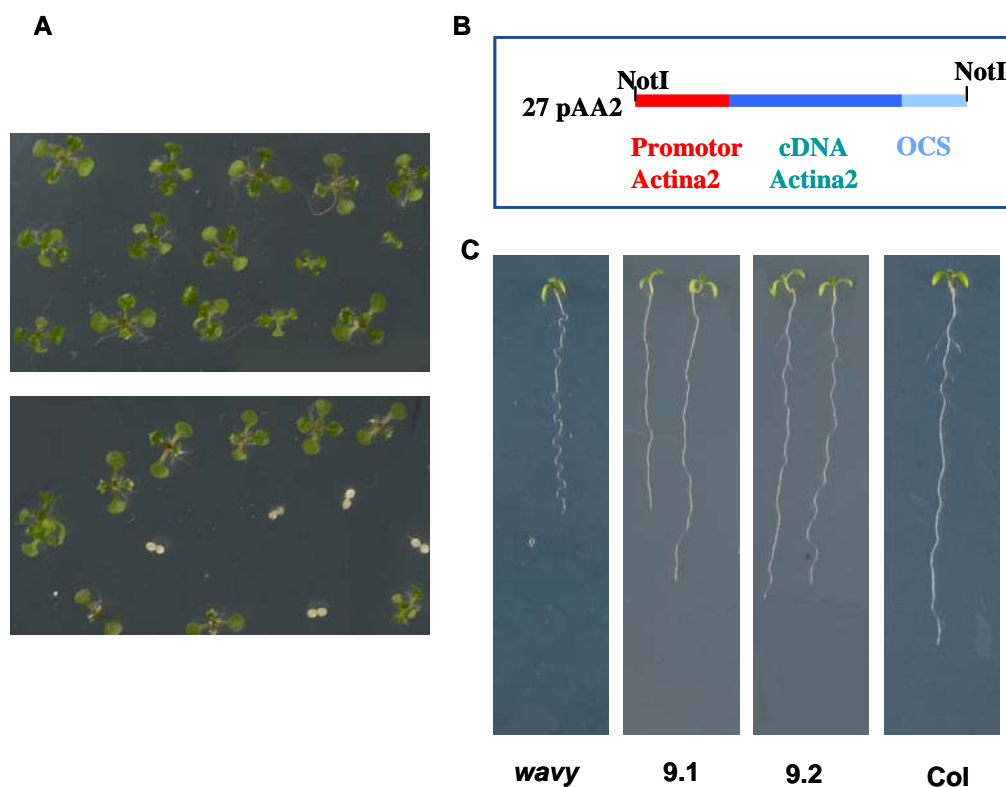
La caracterización fenotípica del mutante *wavy* indica que el gen mutado participa en los mecanismos implicados en los procesos de torsión y al menos parcialmente en la respuesta a choque de las raíces. Por ello nos propusimos clonar el gen mutado. Dado el fenotipo tan claro, así como su segregación como una mutación recesiva (Fig. 18), el gen *wavy* es un candidato idóneo para ser identificado mediante clonación posicional. Para ello el mutante fue retrocruzado tres veces con su planta silvestre Col, para segregar otras mutaciones. La planta retrocruzada se cruzó con plantas del ecotipo Ler y en la F2 se seleccionaron las plantas con fenotipo mutante en placas verticales con medio MSBN. Los ADNs de las plantas seleccionadas se utilizaron en reacciones de PCR utilizando marcadores moleculares de tipo SSLPs o CAPS para encontrar la zona del genoma ligada a la mutación *wavy*.



**Figura 19. Identificación de la mutación *wavy*.** A) Marcadores moleculares de tipo SSLPs y CAPs empleados para el análisis de las segregaciones de los cruzamientos entre el mutante *wavy*. (A) Marcadores utilizados en el cartografiado de baja y alta resolución que permitieron acotar la mutación en una región comprendida entre los BACs MYF24 y MCB22. (B) Localización de la mutación *wavy* en el 2º exón del gen At3g18780 que codifica para la proteína ACTINA2 alterada con un cambio aminoacídico de una arginina a una cisteína en la posición 179.

Las 42 primeras plantas F2 de fenotipo *wavy* se utilizaron para hacer un barrido del genoma usando marcadores de todos los cromosomas localizando así la mutación en una zona del cromosoma III delimitada por los marcadores nga162 y AthGapab. Una vez delimitada esta zona se continuó con la selección de plantas mutantes, se extrajo el ADN y se diseñaron marcadores arriba de AthGapab y abajo de nga162 para acotar aún más la zona de la mutación. Tras analizar 1100 plantas utilizando 32 marcadores moleculares de tipo SSLPs y CAPS se restringió la mutación en una zona del BAC MVE11 que comprende 16 genes. Entre ellos, en esa zona se encuentra el gen de *ACTINA2* (Fig. 19). Dado que previamente se había implicado a la tubulina, y por tanto

al citoesqueleto, en fenómenos de torsión, decidimos secuenciar este gen comprobando que en el mutante *wavy* el gen de *ACTINA2* presenta un cambio nucleotídico de una citosina por una timina en la posición 1113 localizada en el segundo exón. Este cambio puntual se traduce en un cambio aminoacídico de arginina (CTG) a cisteína (TGT) en la posición 179 de la proteína *ACTINA2*.



**Figura 20. Complementación de la mutación *wavy*.** A) Selección de plantas transgénicas resistentes a 50 mg/l del antibiótico kanamicina suministrado en el medio MS. 1. Línea homocigota para la construcción y 2. Línea heterocigota. B) Construcción portadora del promotor endógeno fusionado al ADNc del gen que codifica para la proteína Actina2 C) Ejemplo de dos líneas homocigotas 9.1 y 9.2 para la construcción.

### 2.3.3.- Complementación del fenotipo *wavy*

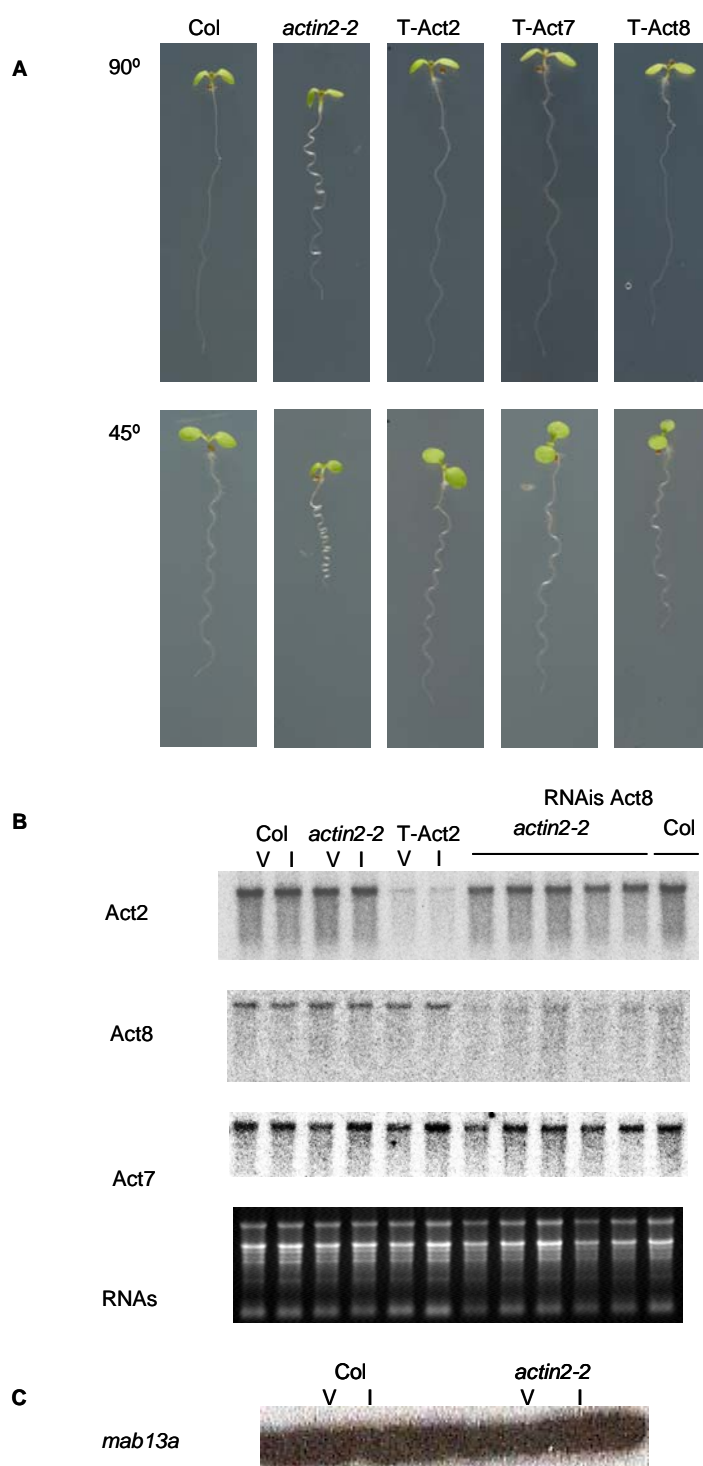
Con el fin de demostrar que la mutación encontrada en el gen *WAVY* era responsable del fenotipo, se generaron plantas transgénicas transformando plantas mutantes *wavy* con el vector 27pAA2, portador de una construcción que contenía una fusión del promotor endógeno del gen *ACTINA2* fusionado a su ADNc. (Fig. 20B). Las plantas transformadas se seleccionaron por su resistencia a kanamicina (Fig. 20A). Se eligieron 20 líneas homocigotas para el gen de la kanamicina en la generación T3 y se

estudiaron sus fenotipos. En 14 líneas se encontró que el gen de la *ACTINA2* silvestre es capaz de complementar la mutación puesto que el fenotipo de raíz era de nuevo idéntico al de las plantas Col silvestres. En la figura 20C se muestra un ejemplo del fenotipo de raíz de dos líneas complementadas, 9.1 y 9.2. Por tanto el gen *WAVY* codifica para la proteína *ACTINA2*. Curiosamente ninguno de los alelos mutantes de *actina2* descritos previamente mostraban un fenotipo tan pronunciado, limitándose a leves torsiones en los pelos radiculares (Gilliland y col., 2002; Ringli y col., 2002; Diet y col., 2004). A partir de este momento el mutante *wavy* se denominó *actin2-2*.

#### 2.3.4 Papel del citoesqueleto en procesos de torsión y/o choque.

La capacidad de respuesta al choque exhibida por el mutante *actin2-2* podría indicar que el fenotipo es independiente de la respuesta a choque (1) o que la mutación provoca una hipersensibilidad al estímulo (2). Esta última posibilidad podría ser debida a un incremento de las otras isoformas de actina por un fenómeno de compensación ante la falta de funcionalidad de la proteína *ACTIN2-2*.

El mutante *actin2-2* identificado en esta tesis es el primer mutante de un gen de actina que muestra un fenotipo de torsión en raíces y parte aérea. El mutante nulo de inserción de la *ACTINA2*, *actin2-1* previamente descrito solo muestra alteraciones en el desarrollo de los pelos radiculares (Ringli y col., 2002). Como se muestra en la figura 21A un mutante de inserción y por tanto nulo del gen *ACTINA2* (T-Act2) muestra un fenotipo de respuesta a choque indistinguible de las plantas silvestres, lo que sugiere que la redundancia funcional de las isoformas de actina deben compensar la falta de funcionalidad de la *ACTINA2*. Esta observación indica que esta proteína no es esencial para la respuesta a choque. Además, mutantes de inserción en el gen *actina7* y de la *actina 8* tampoco mostraron alteraciones en la respuesta a choque (Fig. 21A). Es decir ninguna de las isoformas mayoritarias en raíces son imprescindibles en la respuesta tigmotrópica.

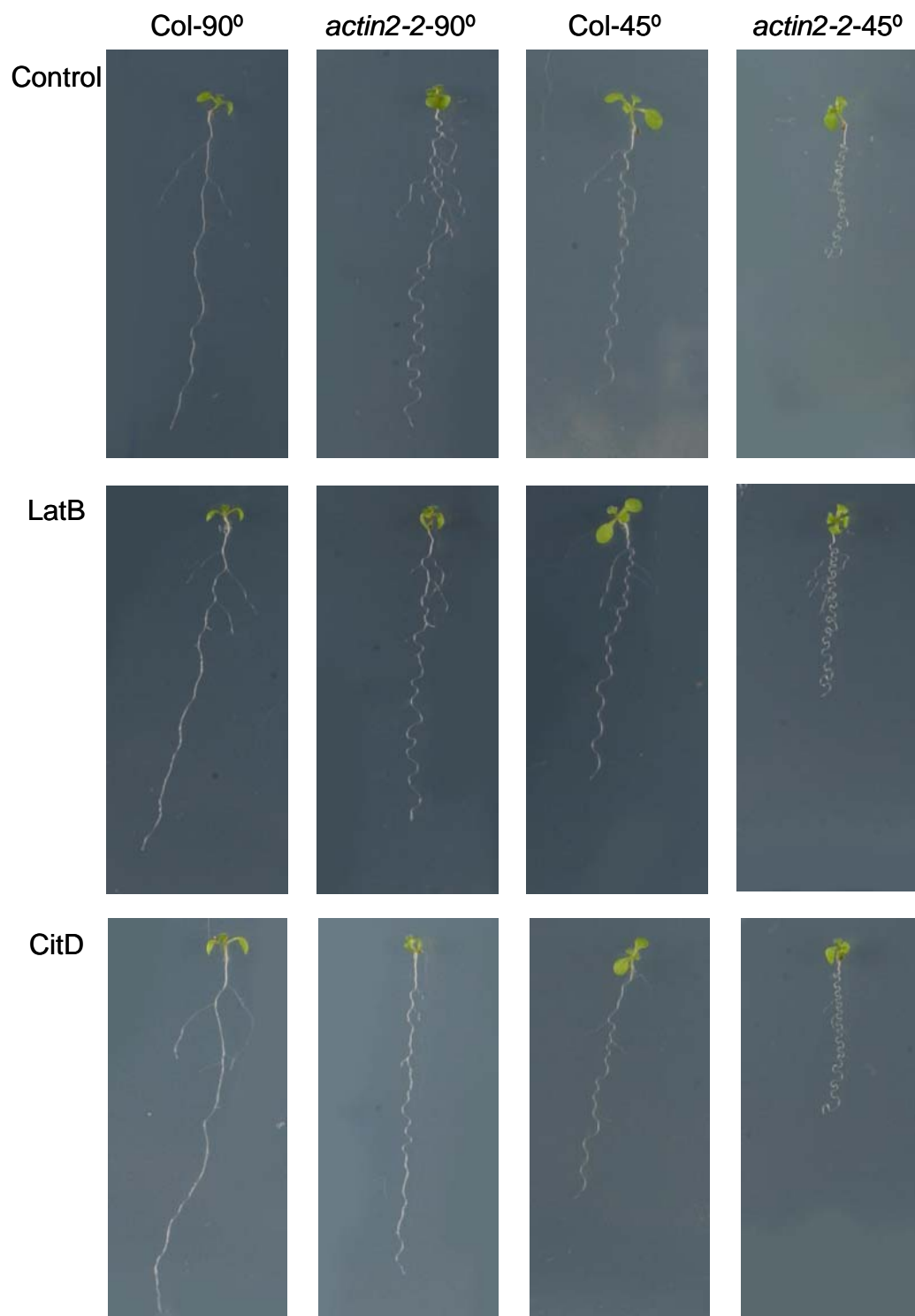


**Figura 21. Fenotipo de la respuesta a choque y niveles de actina en mutantes de Actina2, Actina7 y Actina8.** A) Fenotipo de choque de la raíz de alelos nulos de actina comparados con *actin2-2*. B) Niveles de RNA de las tres isoformas de actina características de la raíz (*ACTINA2*, *ACTINA7* y *ACTINA8*) en el fondo mutante *actin2-2*, en el mutante de inserción T-Act2 y en 5 líneas de silenciadas por RNAi de la *ACTINA8* en fondo *actin2-2* y en fondo Col. C) Niveles de proteína actina en el mutante *actin2-2* y Col. En todos los casos las plantas se crecieron en placas verticales (V) o inclinadas (I) para estimular la respuesta a choque.



Con el objetivo de caracterizar más en detalle el fenotipo del mutante *actin2-2*, nos propusimos descartar la posibilidad de que el incremento en el número de ondas mostrado por el mutante se debiera a una compensación de los niveles de actina total por parte de otras isoformas. La hipótesis de partida se centró en el hecho de que la proteína ACTINA2 pudiese estar participando en la respuesta de choque junto con las isoformas de ACTINA7 y ACTINA8, que son las que se expresan de manera mayoritaria en la raíz. La falta de funcionalidad de la ACTINA2 en el mutante *actin2-2* podría provocar mediante un fenómeno de compensación un aumento en los niveles de las isoformas 7 y 8 si estas también participaran en la respuesta tigmotrópica. Esta compensación podría provocar un incremento en los niveles de actina total lo que explicaría que el mutante respondiera de forma hipersensible al estímulo incrementando la respuesta de choque en el mutante por encima de la observada en plantas silvestres. Con este fin, se analizaron los niveles de ARN de las 3 isoformas de actina de raíz en plantas silvestres y mutantes (Fig. 21B). En este experimento además de utilizar el mutante *actin2-2*, se utilizó también el alelo nulo de ACTINA2, (T-Act2), líneas RNAi de la ACTINA8 en fondo *actin2-2* y Col generadas en el laboratorio. En la figura 22A se muestran los niveles de mensajero de las tres isoformas de actina mayoritarias en raíz en las plantas mutantes crecidas en placas verticales e inclinadas. En ninguno de los casos se encontró una diferencia significativa entre los niveles de expresión de las plantas mutantes y Col. Incluso el alelo nulo, T-Act2, mostró niveles similares de ARN de las isoformas de actina 7 y 8. Estos datos sugieren que al menos a nivel de ARN no existe una compensación entre las isoformas de actina en la raíz, aunque ello no descarta que los niveles de proteínas estén alterados.

Por ello se determinó la cantidad total de actina en el mutante *actin2-2* y plantas silvestres. Con este fin se realizó mediante un ensayo tipo western utilizando un anticuerpo monoclonal de plantas denominado mab13a (SIGMA). Este anticuerpo reconoce todas las isoformas vegetativas (ACT2, ACT4, ACT7, ACT8 y ACT12) de actina en *Arabidopsis* y por tanto no es capaz de diferenciar entre las tres isoformas. De todas formas, si la proteína ACTINA2 sufriese una disminución drástica en sus niveles por efecto de la mutación es de esperar que fuéramos capaces de detectarlo midiendo la actina total. Como se observa en la figura 21C, los niveles de actina son similares en las plantas Col y *actin2-2* tanto en placas verticales como inclinadas.

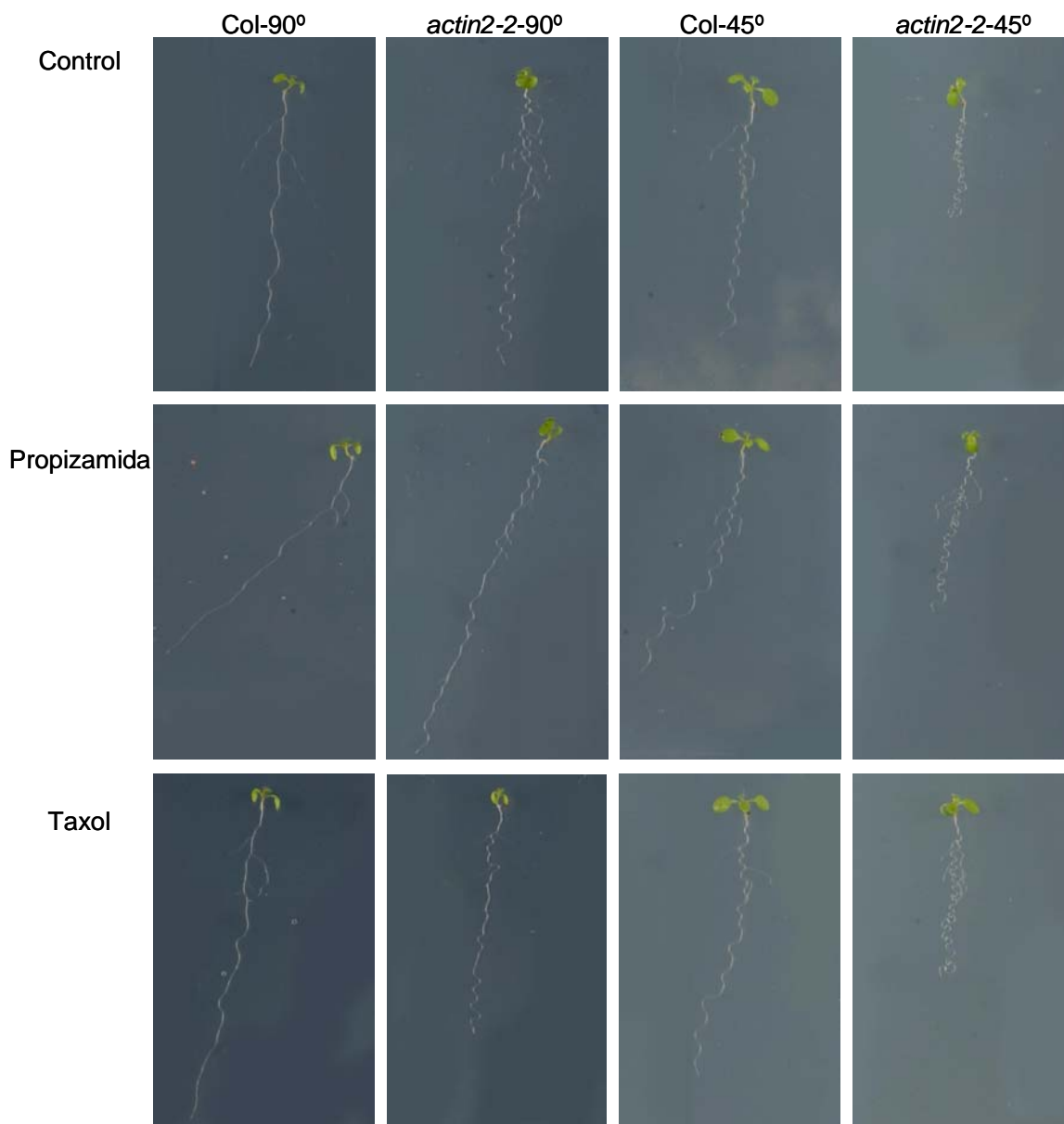


**Figura 22. Estudio del efecto de drogas de actina sobre el fenotipo *actin2-2* y la respuesta de choque.** Las drogas de actina latrunculina B a 17nM no afecta al fenotipo del mutante en las condiciones d estudio. Sin embargo, la citocalasina D a 1μM estira de una forma parcial el fenotipo del mutante. Además ninguna de las drogas afecta a la respuesta de choque.

El papel del citoesqueleto en fenómenos de torsión se ha demostrado en diversas ocasiones (Bao y col., 2001; Hashimoto, 2002; Gilliland y col., 2003; Yuen y col., 2003; Nakajima y col., 2004). Uno de los fenómenos mas estudiados de torsión de raíces es la espiralización. En *Arabidopsis* las raíces de algunos ecotipos crecen girando sobre si mismas en el sentido contrario a las agujas del reloj. En el año 2000 Furutani y col. identificaron un conjunto de mutantes denominados *spr* que tenían alterado el sentido de giro de la raíz principal lo que provocaba un desplazamiento de la raíz hacia la derecha cuando la planta se observa desde el meristemo apical del tallo (Furutani y col., 2000). Los genes *spr* codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina o para proteínas de unión a tubulina e implicados, por lo tanto, directamente en el citoesqueleto permitiendo demostrar el papel de la tubulina en los fenómenos de torsión en plantas. En base a estos resultados y con el fin de determinar la participación del fenotipo *actin2-2* con el de choque decidimos estudiar el efecto de drogas que alteran el citoesqueleto tanto de actina como de tubulina en el fenotipo mutante y su comparación con el efecto de éstas en el fenotipo de choque (Figs. 22 y 23).

Con este fin se crecieron plantas mutantes *actin2-2* en presencia de drogas de actina y tubulina y se valoró el efecto que producían sobre su fenotipo y en respuesta a tigmogénesis en comparación con plantas silvestres. Como drogas despolimerizantes de actina se utilizaron LatB y CitD. Como se observa en la figura 22, ninguno de los dos tratamientos alteró significativamente el patrón de ondulación de las raíces de las plantas *actin2-2* ni las de las plantas silvestres sometidas a choque. Sin embargo el tratamiento con CitD disminuyó la intensidad del fenotipo mutante en placas verticales. Este resultado sugiere que el fenotipo del mutante *actin2-2* podría ser independiente del fenotipo de choque. Por otro lado como drogas de tubulina se utilizó la propizamida, un agente despolimerizante de microtúbulos y el taxol, un agente estabilizante de los microtúbulos. El tratamiento con propizamida altera el grado de espiralización de la raíz desplazando el crecimiento de la raíz hacia un lado. Como se observa en la figura 23, el tratamiento con propizamida disminuye la intensidad de las ondas que forma el mutante *actin2-2* en placas verticales. Sin embargo al igual que las drogas de actina la propizamida no altera significativamente el fenotipo de choque de las plantas silvestres. El tratamiento con Taxol provoca la desaparición del crecimiento ondulado característico del mutante *actin2-2*, mientras que las ondas características del fenotipo de choque se transforman en bucles (Fig 23). Curiosamente estos bucles no aparecen en

el mutante *actin 2-2* lo que vuelve a indicar que el fenotipo característico de la respuesta de tigmogénesis debe ser al menos parcialmente independiente del patrón de crecimiento en forma de ondas que muestra la raíz mutante *actin2-2*.



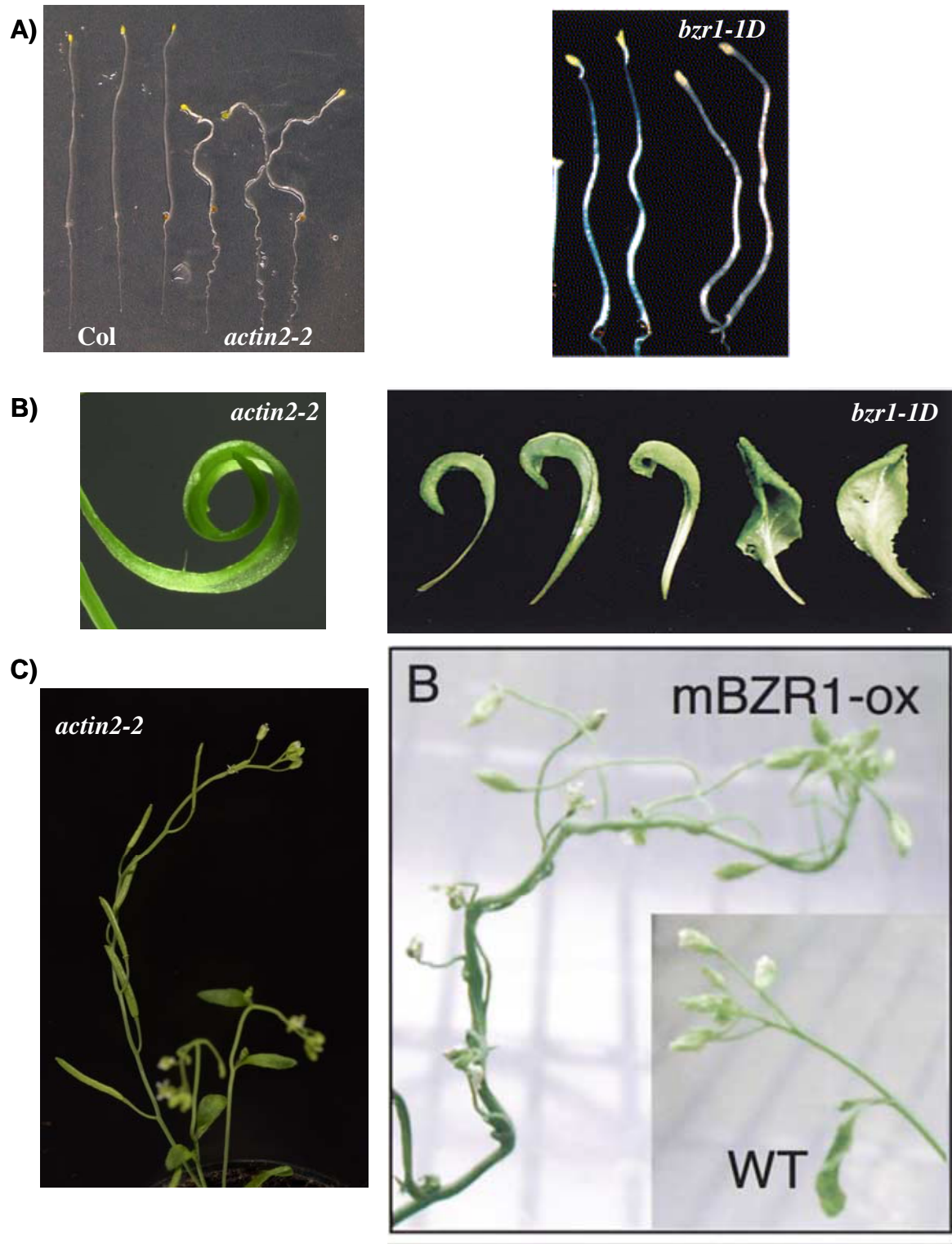
**Figura 23. Estudio del efecto de drogas de tubulina sobre el fenotipo *actin2-2* y la respuesta de choque.** Las drogas de tubulina propizamida a 2  $\mu$ M y taxol a 1  $\mu$ M estiran el fenotipo de torsión de la raíz del mutante pero no afectan al patrón de ondulación característico de la respuesta de choque.

### 2.3.5. Papel de la ruta de señalización de brasinoesteroides en los procesos de torsión mediados por ACTINA2.

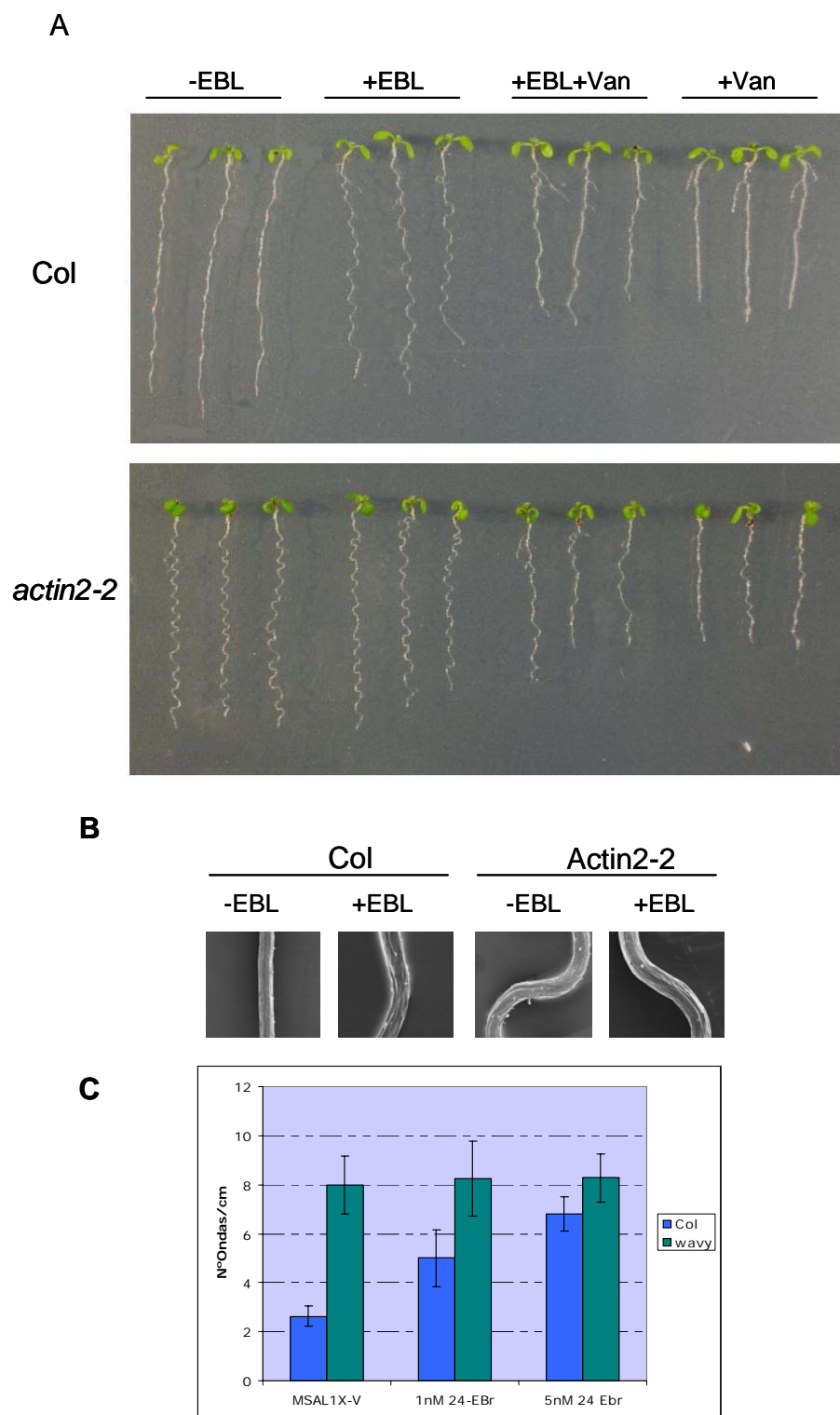
Los BS son hormonas vegetales que han sido relacionadas con fenómenos de elongación en respuesta a luz (Clouse y col., 1996; Szekeres y col., 1996; Catterou y col., 2001; Yin y col., 2002; Mussig y col., 2003). Mutantes alterados en la síntesis de BS o insensibles a la hormona, no elongan su hipocotilo en oscuridad presentando un fenotipo similar al de plantas crecidas en presencia de luz (Szekeres y col., 1996; Mussig y col., 2006). Curiosamente estos mutantes presentan fenotipos de torsión similares a los observados en las hojas del mutante *actin2-2* (Fig. 24A). En este sentido es importante resaltar la enorme semejanza fenotípica apreciable entre las hojas de la roseta del mutante *actin2-2* y el mutante de respuesta constitutiva a BS denominado *bzr1-ID* (Fig. 24B) (Wang y col., 2002). En ambos mutantes las hojas caulinares están curvadas. Por otro lado el fenotipo de la parte aérea del mutante *actin2-2* es muy similar al que se origina en las plantas que sobre-expresan la proteína BZR portadora de una mutación que origina la activación constitutiva de la ruta de señalización de las hormonas BS. En ambas plantas los tallos se desarrollan dando aspecto quebrado mientras las vainas se enrollan en torno al tallo y los pétalos se mantienen abiertos desde su floración (Fig. 24C). Estas observaciones podrían indicar que la respuesta a BS podría estar alterada en el mutante *actin2-2*.

Con el fin de determinar el grado de implicación de los BS en el fenotipo mutante *actin2-2* y por tanto en la ACTINA2 se analizó el patrón de crecimiento de la raíz en presencia de concentraciones nanomolares de EBL, componente mayoritario dentro de la familia de los BS. Como se observa en la figura 25A el tratamiento con la hormona provoca en plantas Col el crecimiento ondulado de la raíz principal mimetizando el fenotipo de raíz del mutante incluso a una concentración de 1nM. Sin embargo el fenotipo de raíz de *actin2-2* permanece inalterado a la adición de la hormona, es decir, se comporta como un mutante de respuesta constitutiva a BS.

Como se describió en la introducción, cambios en la fosforilación de tyrosinas de la actina se han relacionado con la respuesta tigmotrópica de las hojas de las plantas



**Figura 24. Semejanzas fenotípicas entre los mutantes *actin2-2* y *bzip1-1D*.** A) Fenotipos de los hipocotilos de las plantas mutantes crecidas en oscuridad. B) Fenotipos de torsión de las hojas. C) Fenotipos de parte aérea del mutante *actin2-2* y de una planta que sobreexpresa la proteína BZR mutada.



**Figura 25. Efecto conjunto del vanadato y el EBL sobre las raíces Col y *actin2-2*.** A) Plantas Col y *actin2-2* respectivamente sometidas de 3 en 3 a los tratamientos en medio MSBN vertical siguientes: 1: control; 2: +5nM de EBL; 3: +5nM de EBLy +50  $\mu$ M de vanadato y 4: +50  $\mu$ M de vanadato. B) Imágenes de criobarrido de las plantas Col y *actin2-2* en presencia de EBL y sus controles correspondientes. C) Cuantificación del efecto de la hormona EBL.

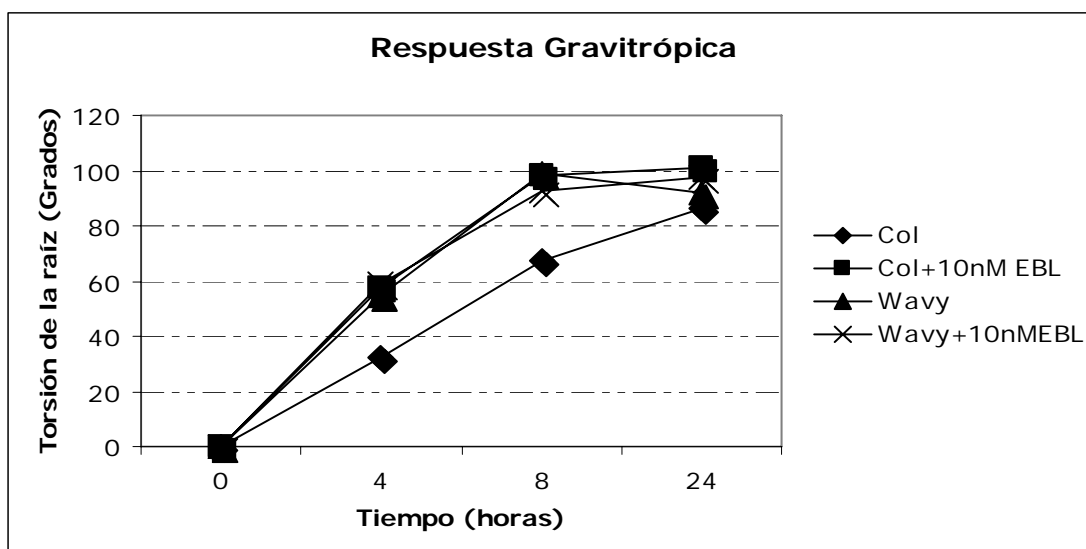
de mimosa (Kameyama y col., 2000). Como se observa en la figura 25A el tratamiento con vanadato, un inhibidor de fosfatasa inhibe tanto la respuesta a BS de las plantas silvestres como el fenotipo del mutante *actin2-2*, lo que indica que ambos fenotipos son similares. De hecho el fenotipo observado en plantas silvestres tratadas con BS es idéntico al fenotipo del mutante *actin2-2*, como se puede observar en las imágenes de criobarrido de la figura 25B. El gráfico de la figura 25C muestra la cuantificación de la respuesta.

La respuesta de las plantas a BS está muy bien estudiada y en general su implicación en procesos de elongación en respuesta a luz es incuestionable (Kim y col., 2000; Clouse, 2002). Recientemente se ha demostrado que los BS aceleran la respuesta a graviestimulación. Cuando una planta se dispone de forma perpendicular al vector gravitatorio la raíz gira 90° para dirigir su crecimiento en el sentido del vector gravitatorio. Además se sabe que esta respuesta, denominada graviestimulación, está acelerada en presencia de BS (Li y col., 2005). En base a estas observaciones decidimos estudiar la respuesta gravitrópica en el mutante *actin2-2*. Como se observa en la figura 26, las raíces de plantas silvestres tratadas con BS completan el giro de 90° en dos horas mientras que en ausencia de BS necesitan el doble de tiempo, mientras que las raíces del mutante responden más rápidamente a la graviestimulación que las plantas silvestres y de forma idéntica a las tratadas con BS. Además el mutante no incrementa la velocidad de respuesta a la graviestimulación en presencia de BS. Es decir, el mutante se comporta nuevamente como insensible a la adición de la hormona. Asimismo este proceso se ha asociado a un incremento de la polarización del transportador de auxinas PIN2.

Como mencionamos arriba en el trabajo de Li y col se demuestra que los BS intensifican el área de localización polar del transportador de auxinas PIN2 en la raíces. Este patrón de localización es idéntico al que se observa en plantas sometidas a graviestimulación indicando que el efecto de los BS en las respuesta gravitrópica esta mediado por cambios en los gradientes de auxinas (Li y col., 2005). Por este motivo decidimos estudiar si el gradiente de auxinas y la localización del transportador PIN2 esta alterado en el mutante *actin2-2* de forma similar a las plantas silvestres tratadas con



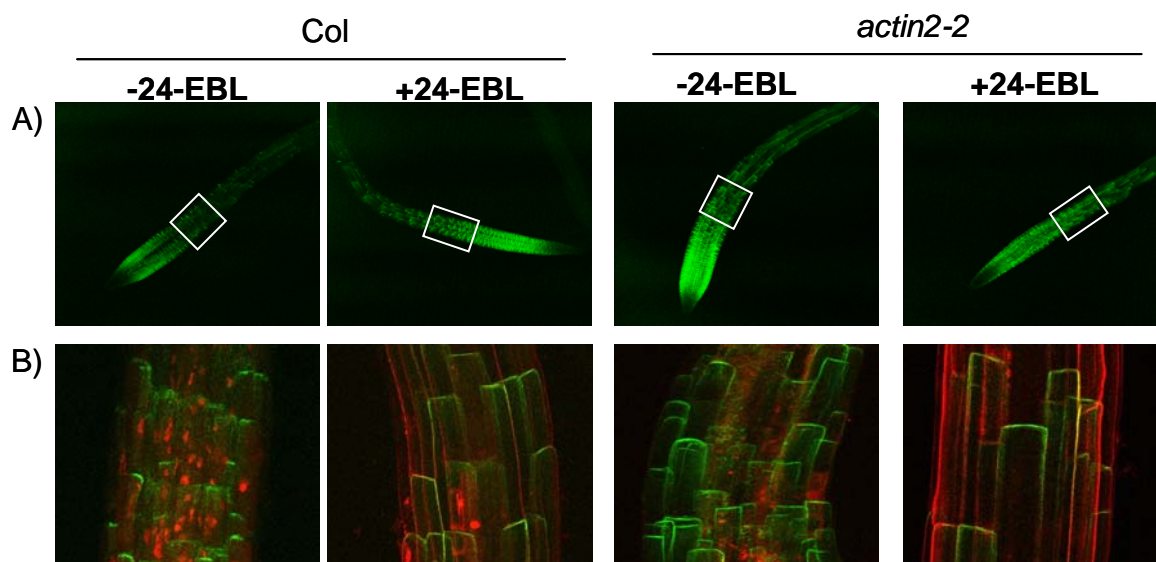
BS. Para ello se generaron plantas transgénicas silvestres y mutantes portadoras de una construcción PIN2-GFP y se comprobó el efecto de los BS en la localización del transportador.



**Figura 26. Estudio del efecto de la hormona EBL en la respuesta gravitrópica.** La gráfica muestra que la hormona EBL produce una aceleración de la respuesta gravitrópica de las plantas Col, mientras que el mutante *actin2-2* se comporta como insensible a la adición de la misma.

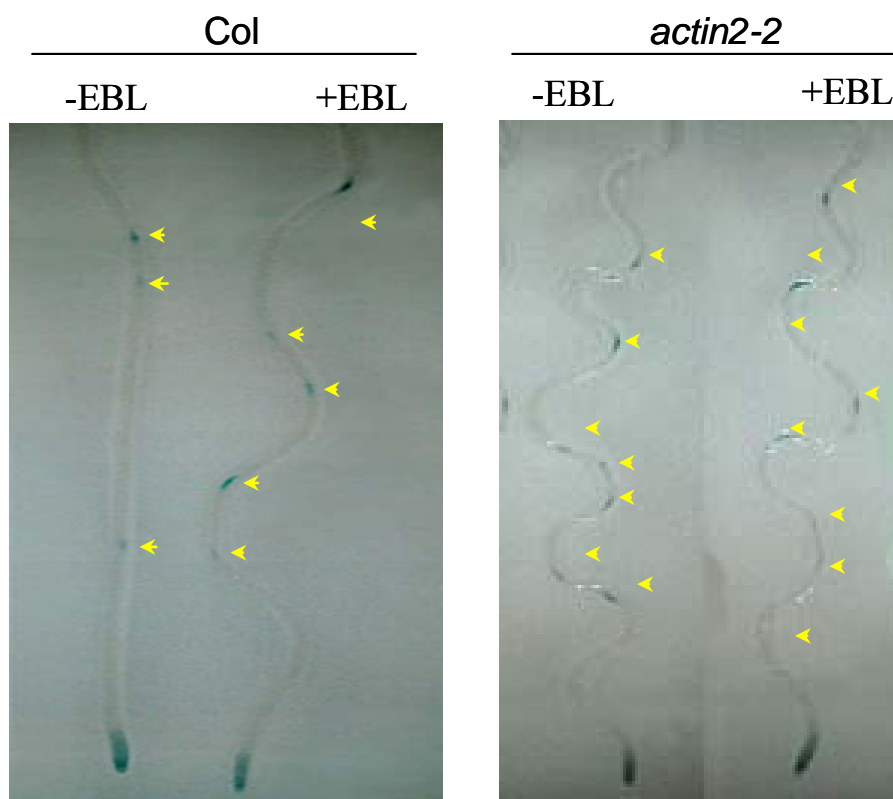
Como se observa en la figura 27 en las plantas mutantes *actin2-2* la señal de fluorescencia ocupa un área más amplia que en las plantas silvestres. Este efecto es idéntico al que se observa en las plantas Col crecidas en presencia de BS. Asimismo en el mutante *actin2-2* se detectó una localización basipétala de los transportadores PIN2 de forma similar a lo observado previamente en plantas silvestres tratadas con BS. En las plantas silvestres sin tratar con BS la localización del transportador de AUXs fue más difusa. Este resultado indica que la acumulación basipétala de los transportadores PIN2 desde el ápice hacia la zona de elongación de la raíz que se observa en plantas silvestres tratadas con BS es idéntica a la que muestra el mutante *actin2-2* en ausencia de la hormona. Además el tratamiento del mutante con BS no modifica el área ni la localización del transportador PIN2. Este resultado refuerza la idea de que el mutante *actin2-2* muestra un patrón constitutivo de respuesta a BS.

En otro experimento decidimos analizar los cambios de acumulación de AUXs en respuesta a BS en las raíces de las plantas silvestres y mutantes. Para ello se utilizó una línea transgénica que contiene una construcción de la región promotora del gen inducible por AUXs *DR5* fusionada al gen reportador *GUS*. El patrón histoquímico GUS en esta línea se caracteriza por marcar los inicios de las raíces laterales (De Smet y col., 2007). El mutante *actin2-2* muestra tinción histoquímica GUS en las caras externas de las ondas y por tanto en las zonas de máxima torsión (Fig. 28). Este resultado se observa también en plantas silvestres crecidas en placas verticales en presencia de BS (Fig. 28). Por tanto la adición de BS y la mutación *actin2-2* provocan alteraciones similares en el patrón de distribución de AUXs en la raíz.



**Figura 27. Expresión y localización de los transportadores PIN2 en las raíces de las plantas Col y *actin2-2* y estudio del efecto de la hormona EBL en la disposición de los mismos.** A) Área de expresión de los transportadores PIN2 en las raíces de las plantas Col y *actin2-2* sometidas a un tratamiento con 5 nM de hormona EBL. B) Tinción con yoduro de propidio donde se aprecia la localización basipétala de los transportadores en el interior de las células en las áreas más diferenciadas.

Todos estos resultados indican que la ACTINA2 participa en los cambios de gradientes de AUXs provocados por los BS. Los BS activan la ruta de señalización de las AUXs ((Nakamura y col., 2003; Nakamura y col., 2004) y esta parece estar activada en el mutante *actin2-2*. Todos los datos presentados indican que el citoesqueleto y más concretamente la ACTINA2 está implicada en la ruta de señalización de los cambios en los gradientes de auxinas mediados por BS y que participan en los fenómenos de torsión que acompañan a las respuestas trópicas plantas.

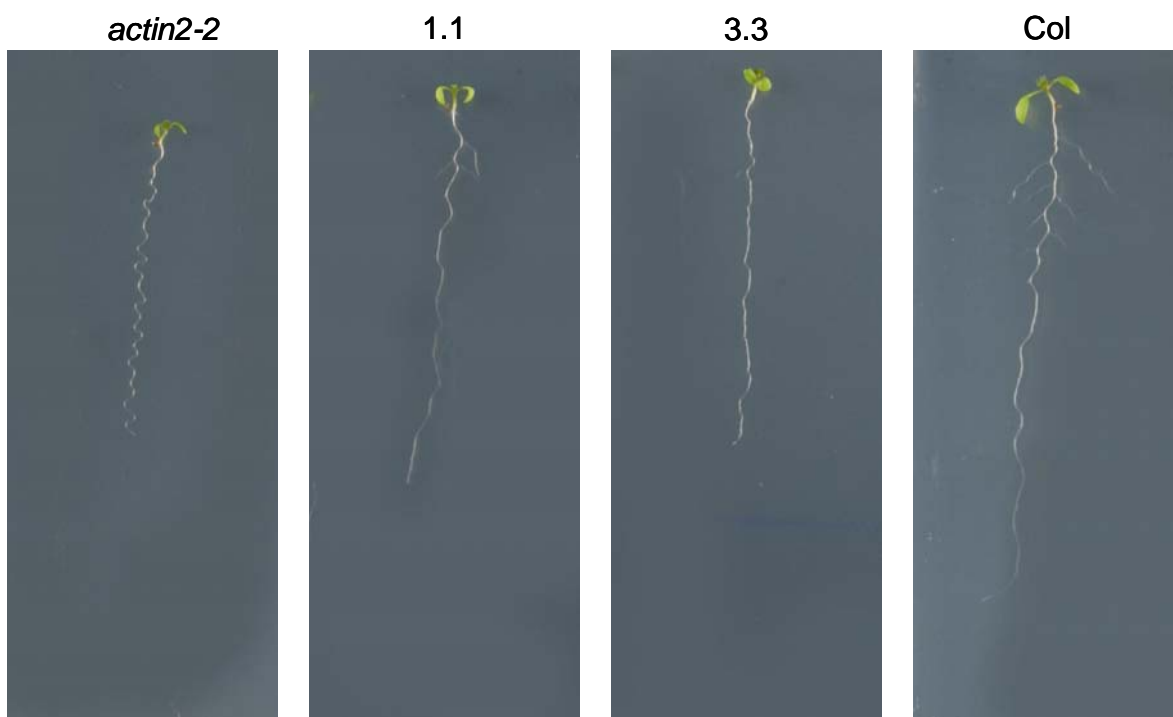


**Figura 28. Estudio del patrón de localización GUS de los transportadores Dr5 en las raíces de 5 días de plantas control y mutantes y efecto de la adición de BS en la expresión de los mismos.**

### **2.3.6. Búsqueda de mutantes supresores del fenotipo *actin2-2*.**

En este trabajo hemos identificado una nueva ruta de señalización de BS implicada en fenómenos de torsión a través del citoesqueleto. Con el fin de identificar nuevos componentes de esta ruta hemos iniciado un escrutinio de mutantes supresores de *actin2-2*. Para ello hemos analizado 42000 semillas de una colección mutagenizada por EMS del mutante en medio MSBN. En un primer escrutinio se han detectado 133 mutantes candidatos por sus fenotipos de pérdida del patrón de ondas de las raíces o aumento en la intensidad de las mismas. En la figura 29 se muestran los mutantes 1.1 y 3.3, dos ejemplos de mutantes supresores. En esta colección hemos elegido 12 mutantes en los que se ha comprobado con un marcador molecular tipo dCAPS la presencia de la mutación *actin2-2*. En la actualidad se está estudiando la respuesta de éstos a los BS y se están recomprobando para elegir los fenotipos más interesantes para ser mapeados mediante paseo cromosómico. La identificación de los genes responsables permitirá

identificar nuevos componentes de la ruta de señalización de BS en la que participa la ACTINA2.



**Figura 29. Ejemplos de 2 mutantes seleccionados en el escrutinio de una población de semillas *actin2-2* mutagenizadas con EMS. Los mutantes 1.1 y 3.3 se han seleccionado en MSBN por su fenotipo de raíz similar a las plantas Col.**

**DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

El estudio de la AR es un factor determinante para optimizar los procesos de captación de nutrientes y agua del suelo y con ello la producción y el rendimiento de los cultivos. A pesar de la importancia agronómica de este carácter, en la actualidad aún se desconocen la mayoría de los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de las raíces y menos aún la disposición espacial del sistema radicular. En este trabajo se ha realizado un abordaje fisiológico, molecular y genético de tres mutantes de *Arabidopsis thaliana* alterados en el desarrollo de su raíz principal. Los dos primeros, *raw2* y *raw3*, muestran una clara pérdida de dominancia apical, insensibilidad a CQs y alteraciones en el patrón de desarrollo vascular. El mutante *raw2* presenta un problema de maduración de las células encargadas de desarrollar el xilema, mientras que el mutante *raw3* está alterado en el proceso de identidad tisular de las células que se diferencian en floema. El tercer mutante denominado *actin2-2* ha facilitado el estudio de los mecanismos implicados en los fenómenos de torsión de las raíces que son determinantes en la capacidad de esquivar obstáculos presentes en el suelo y por tanto de gran importancia en la colonización del mismo influyendo decisivamente en la eficacia en la captación de nutrientes, y agua así como la capacidad de anclaje. El mutante *actin2-2* manifiesta un fenotipo de torsión constitutivo en la raíz similar al que se produce en las plantas tratadas con BS. Este mutante ha permitido otorgar un papel nuevo a la proteína ACTINA2 en los procesos de torsión de la raíz de *Arabidopsis* y además es la primera vez que se implica esta proteína con la ruta de señalización de las hormonas BS.

### 1.- ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL TEJIDO VASCULAR DE LOS MUTANTES *raw*

En esta tesis se han caracterizado dos mutantes, *raw2* y *raw3*, insensibles a CQs, asimismo estos mutantes presentan alteraciones en el desarrollo de tejido vascular. El mapeo de las zonas que contienen los genes *RAW2* y *RAW3* indica que en éstas no existe ningún candidato conocido de la ruta de señalización de las hormonas CQs.

El mutante *wol* es similar a los mutantes *raw* aquí identificados. Este mutante presenta un defecto en el número de células iniciadoras que van a producir las células

del xilema y floema y como consecuencia de esto no desarrolla correctamente el haz vascular, lo que impide el crecimiento de la raíz principal (Mahonen y col., 2000). Este mutante al igual que *raw2* y *raw3* es insensible a CQs. Sin embargo la alteración en el desarrollo del tejido vascular que muestran los mutantes *raw2* y *raw3* es diferente. Los dos mutantes desarrollan una raíz corta, pero los procesos alterados en ambos son distintos. El mutante *raw2* manifiesta un problema de maduración del xilema y sus haces vasculares muestran un retraso en la vascularización primaria y en el crecimiento de la raíz. Por el contrario, en el mutante *raw3* la pérdida de la dominancia apical de la raíz principal se debe a una alteración en el proceso de identidad de las células destinadas a especializarse en tejido floemático. En este caso, las células encargadas de desarrollar el floema se desarrollan lignificadas, similares a las del xilema. La lignificación de las células sucede tanto en vascularización primaria como en secundaria.

En el mutante *wol* se produce un fallo en la división de las células que hace que todas las células se destinen a la formación de protoxilema (Scheres, 1997; Mahonen y col., 2000; Nishimura y col., 2004). En el mutante *raw2*, las células precursoras del xilema y floema están intactas. Sin embargo, la maduración de las células xilemáticas está bloqueada y éstas permanecen en estadio de metaxilema como se puede observar en los cortes histológicos de las raíces teñidas con azul de toluidina.

El xilema es el tejido vascular de soporte encargado del transporte del agua y de los nutrientes del suelo desde la raíz al tallo (Dinneny y Yanofsky, 2004). Su desarrollo comprende varias fases: En primer lugar, comienza la división de unas células predeterminadas como precursoras en el proceso de xilogénesis. A continuación se activa la cascada de señalización en dichas células y se produce su elongación. El siguiente paso es la adquisición de la especificación celular que va seguido de un proceso de síntesis y deposición de pared celular en las células, lignificación y muerte celular programada (McCann y col., 2001). El mutante *raw2* está alterado en el proceso de lignificación. Esta fase del desarrollo ha sido una de las más estudiadas hasta la actualidad y ha arrojado un gran número de mutantes de *Arabidopsis* implicados cuyos elementos vasculares se hallan alterados (Turner y Somerville, 1997). El mutante *irx3* (*irregular xylem3*) presenta una alteración en el gen que codifica para la enzima celulosa sintasa y como consecuencia de este fallo, no se forman correctamente los

polímeros de celulosa de la pared celular secundaria y el xilema se desarrolla de forma aberrante (Taylor y col., 1999). Sin embargo, otro mutante afectado en el proceso de xilogénesis, el mutante *ixr4* (*Irregular Xylem4*), está directamente relacionado con la ruta de síntesis de lignina, ya que muestra una anomalía en el gen que codifica para la enzima cinamoil CoA reductasa, que es la causante de que el contenido de lignina en este mutante se reduzca a la mitad (Jones y col., 2001). Otros mutantes de síntesis de lignina y que presentan un fenotipo de protoxilema inmaduro son *eli1* (*ectopic lignification 1*) y *elp1* (*ectopic deposition of lignin in pith 1*) (Cano-Delgado y col., 2000; Zhong y col., 2000). Por último es importante destacar los mutantes relacionados con el metabolismo de los fenilpropanoides, que derivan en una alteración en la producción de lignina. Esta ruta metabólica se activa en las plantas en presencia de luz, patógenos, daño y en determinados estadios del desarrollo participando en la formación del xilema. Su función es sintetizar compuestos fenólicos (como la lignina) para el desarrollo del tejido vascular y en respuesta a patógenos para evitar la dispersión del invasor (Rohde y col., 2004). La familia de genes *PAL* (*PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE*) de esta ruta han sido los más estudiados por sus efectos significativos en el contenido de lignina de las plantas y porque generan muchos fenotipos pleiotrópicos al alterar el desarrollo del tejido xilemático (Elkind y col., 1990), sobre todo *PAL1* y *PAL2* ya que son los primeros componentes de la ruta de lignificación de *Arabidopsis* (Raes y col., 2003). En cultivos celulares de tabaco se ha visto que el aporte exógeno de hormonas CQs activa la ruta de los fenilpropanoides, lo que indica que las CQs son importantes en el proceso de xilogénesis (Nagai y col., 1994). El mutante *raw2* es insensible a la adición de hormonas CQs y presenta una alteración en el desarrollo del xilema, por lo que es posible que en esta planta se esté retrasando la ruta de los fenilpropanoides y con ello la maduración del tejido vascular por ausencia de formación de lignina.

Todos estos mutantes relacionados con el proceso de lignificación muestran un fenotipo en el tejido vascular similar al del mutante *raw2*. El aspecto del xilema en muchos de ellos es reticulado, lo que indica que existe una alteración en la síntesis de alguno de los componentes de la pared y el proceso de lignificación. La identificación del gen *RAW2* permitirá relacionar a las QTs con el desarrollo del tejido vascular aportando un nuevo componente en el proceso de lignificación, relacionado con las CQs.



En el mutante *raw2* el desarrollo del sistema vascular en adventicias y parte aérea no está alterado lo que indica que se trata de un mutante de desarrollo embrionario. Por el contrario, en el mutante *raw3* la raíz principal tiene una longitud superior y permite el desarrollo de raíces laterales y adventicias estableciendo un patrón con un aspecto hiperfasciculado lo que sugiere que el control de la dominancia apical es suficiente para provocar la transición de raíz pivotante a fasciculada. El mutante *raw3* presenta un problema de identidad tisular, ya que desarrolla xilema en células que deberían formar floema como muestran las imágenes de los cortes histológicos. La diferenciación celular parece estar alterada en este mutante ya que las células floemáticas y algunas corticales aparecen engrosadas. Los únicos mutantes descritos que presentan alteraciones similares a las del mutante *raw3* son *apl* y *ahp6*. En el mutante *apl* todas las células floemáticas se desarrollan lignificadas y similares a las del xilema. El gen *APL* codifica para un factor de transcripción tipo Myb que se requiere para que el floema adquiera su identidad. Este gen actúa como un represor de la diferenciación del xilema y el resultado es que el mutante no desarrolla floema y todos los tipos celulares vasculares aparecen engrosados en lignina constituyendo tejido xilemático. El gen *APL* juega un doble papel en el desarrollo del tejido vascular, ya que por un lado induce la diferenciación de las células floemáticas y por otro se ha visto que las sobre-expresiones de este gen reprimen el desarrollo del xilema (Bonke y col., 2003). Además cuando se expresa este gen bajo el control del promotor del gen *WOL* se inhibe el desarrollo del xilema en algunas células puesto que se está expresando *APL* en lugares en los cuáles se diferencia el xilema reprimiendo su desarrollo (Bonke y col., 2003). *APL* es el primer gen cuya función ha sido identificada que es específicamente requerida para la adquisición de la identidad vascular en plantas, pero aún queda mucho camino por recorrer para identificar otros genes de la ruta de formación y desarrollo del tejido floemático. En este sentido, el gen *RAW3* puede tener un papel en la adquisición de la identidad de las células floemáticas. El hecho de que la región en la que se encuentra acotada la mutación es diferente del locus de *APL* cobra mucha importancia en este estudio, ya que el descubrimiento de este gen puede aportar un nuevo eslabón entre el patrón de desarrollo del tejido vascular y la señalización por CQs.

En el año 2006 el grupo de Mähönen identificó el gen *AHP6*. La expresión de este gen favorece la especificación del xilema y actúa como represor de las hormonas

CQs en su papel de reguladoras negativas del desarrollo de protoxilema. Las CQs además reprimen la expresión del gen *AHP6*. Por lo tanto el gen *AHP6* y las CQs tienen papeles contrarios en la especificación del xilema (Mahonen y col., 2006). Este proceso se inicia cuando se unen las moléculas de CQs a los receptores CRE se activa la transferencia de grupos fosfato desde moléculas de ATP a residuos de histidina presentes en las proteínas AHPs conocidas (de la 1 a la 5) y como consecuencia se activa la cascada de señalización que impide la diferenciación de las células del protoxilema (Hwang y col., 2002; Kakimoto, 2003). La proteína AHP6, a diferencia del resto de proteínas de su familia, no posee ningún residuo de histidina en su estructura comportándose como una pseudo AHP. De hecho esta proteína interacciona con la maquinaria del fosfato inhibiendo la fosforilación de los residuos de histidina de los auténticos AHPs impidiendo así la señalización de CITS, favoreciendo el desarrollo del xilema (Mahonen y col., 2006). Por otra parte se sabe que las CQs tienen un importante papel en el control de la adquisición de la especificidad tisular en las células destinadas a formar protoxilema. Las hormonas CQs reprimen la diferenciación del protoxilema a partir de las células del PC. El mutante *raw3* es muy insensible a las hormonas CQs y desarrolla células xilemáticas en células no programadas para su formación. Así que la represión de las CQs en la formación del tejido xilemático no está funcionando en el mutante y tal vez se favorezca por tanto la expresión del gen *AHP6* y con ello se potencie el desarrollo del xilema en las células del floema en vascularización primaria y en las células del parénquima cortical en vacularización secundaria. Experimentos adicionales permitirán determinar la conexión entre el gen *AHP6* y *RAW3*.

En este trabajo se ha realizado una identificación y caracterización fenotípica de dos mutantes, *raw2* y *raw3*, insensibles a las hormonas CITS que presentan alteraciones en el desarrollo del tejido vascular. En el mutante *raw2* el proceso de lignificación está afectado y el xilema de la raíz no se desarrolla correctamente. El hallazgo del gen *RAW2* permitirá averiguar un gen nuevo de la ruta de xilogénesis. Sin embargo, el mutante *raw3* presenta una alteración en la adquisición de la identidad tisular en las células floemáticas y se deposita lignina en células no predeterminadas para formar xilema. Este gen revelará un nuevo componente de la señalización en el proceso de especificación del floema de *Arabidopsis*.

## 2.- IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA ACTINA2 EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS HORMONAS BRASINOESTEROIDES

En este trabajo se ha caracterizado el mutante *actin2-2* de *Arabidopsis thaliana* que muestra un fenotipo de torsión en la raíz similar al que presentan las plantas que han sido sometidas a un tratamiento con BS. Hasta este momento es el único mutante de ACTINA2 descrito que desarrolla este patrón de crecimiento en ondas en su raíz principal. Los mutantes de ACTINA2 descritos en la bibliografía presentan malformaciones en el desarrollo de los pelos radiculares, pero no existen referencias que relacionen a la ACTINA2 con fenómenos de torsión ni en raíz principal ni en parte aérea. El mutante nulo para el gen de la ACTINA2 denominado *act2-1* fue el primero que se describió como alterado en la elongación de pelos radiculares (Gilliland y col., 2002). Más tarde se clonaron los mutantes *der* (*deformed root hairs*) (en fondo C24) portadores de cambios puntuales en la secuencia aminoacídica de la proteína que conferían cambios en el fenotipo de las plantas similares a los del mutante *act2-1* (Ringli y col., 2002). Asimismo en el mutante débil *der1-1*, la ausencia de pelos radiculares se debe a un cambio puntual de una alanina por una valina en la posición 183 y en los alelos fuertes *der1-2* y *der1-3* los cambios se producen en la arginina 97 que cambia a histidina y a cisteína respectivamente (Ringli y col., 2002). En este punto cabe destacar que el mutante *der1-3* se origina por un cambio de una arginina a una cisteína, similar a la mutación *actin2-2* aunque en una posición diferente. Otro alelo mutante de la ACTINA2, denominado *enl2* (*enhancer of irx1*) produce una proteína ACTINA2 aberrante, truncada en los últimos 22 aminoácidos del extremo carboxilo y tampoco en este caso se mostraron fenotipos similares a los del mutante *actin2-2* (Diet y col., 2004). El mutante *actin2-2* también muestra malformaciones en el desarrollo de pelos radiculares, lo que indica que cualquier pequeña alteración de la ACTINA2 siempre lleva asociado la falta de pelos radiculares.

Por otra parte se han encontrado fenotipos ondulados en los pelos radiculares de mutantes alterados en proteínas GTPasas denominadas ROP2. Éstas proteínas actúan como señalizadores entre las proteínas del complejo ARP (ACTIN RELATED PROTEINS) de unión a actina y la actina en sí mediando las dinámicas de polimerización del citoesqueleto (Szymanski, 2005). Las proteínas ROP se han relacionado con procesos de elongación en *Arabidopsis*. La proteína ROP1 fue la

primera que se estudió y se implicó en la formación del tubo polínico (Fu y col., 2001). Esta proteína es la encargada de establecer una red de fibras de actina en el ápice del tubo polínico para que de comienzo su crecimiento y desarrollo (Fu y col., 2001; Li y col., 2001). Sin embargo, la proteína ROP2 actúa de manera similar a ROP1 pero en los pelos radiculares y en la raíz. ROP2 se ha implicado en el desarrollo de pelos, establecimiento los inicios de los mismos y su crecimiento en el extremo de la raíz (Li y col., 2001; Jones y col., 2002; Gu y col., 2004; Xu y Scheres, 2005). Así mismo se conoce que una mutación dominante negativa para la proteína ROP2 provoca un fenotipo de pelos ondulados (Jones y col., 2002). Esta coincidencia de fenotipos entre la raíz principal del mutante *actin2-2* y los pelos radiculares del mutante *rop2-DN* indica que una incorrecta polimerización en las fibras de actina provoca manifestaciones en forma de ondas. Estos fenotipos también se han obtenido tratando las plantas con las drogas despolimerizantes de actina citD y latB en la raíz y en los pelos radiculares (Miller y col., 1999; Baluska y col., 2000; Fu y Yang, 2001). Con todos estos datos podemos afirmar que el alelo *actin2-2* es único, ya que ninguno de los alelos previamente descritos presenta ningún fenotipo asociado a los procesos de torsión de raíz y parte aérea.

El fenotipo del mutante *actin2-2* no muestra una pérdida de función y por ello debería comportarse como un gen dominante, sin embargo en las condiciones de nuestro estudio se manifiesta como un mutante recesivo. Únicamente hemos observado semidominancia en el caso de los cruzamientos de plantas *actin2-2* con plantas portadoras de un alelo nulo para el gen de la *ACTINA2*. En estos casos y solo el 50% de las veces hemos observado plantas F1 con fenotipo *actin2-2*. Estos resultados se pueden explicar si tenemos en cuenta la redundancia génica de la familia de las actinas en *Arabidopsis*. La proteína *ACTINA2* es la isoforma de actina mayoritaria en los tejidos vegetativos y, junto con la *ACTINA8* y la *ACTINA7* se expresa en las raíces, aunque la *ACTINA7* lo hace en estadios tempranos del desarrollo y la *actina8* en momentos puntuales y relacionados con respuestas a estreses. La *ACTINA2* y la *ACTINA8* son idénticas salvo en el tercer aminoácido que es un ácido glutámico en la *ACTINA2* y un ácido aspártico en la *ACTINA8* (An y col., 1996). Se piensa que la *ACTINA8* evolucionó de la *ACTINA2* para asegurar su papel en todos los procesos fisiológicos (McKinney y col., 1995). Por tanto la ausencia de fenotipos observados para los mutantes de las isoformas de actina, incluso en el caso de mutantes nulos, siempre se ha

asociado a la redundancia funcional existente. La identificación del mutante *actin2-2* sugiere por el contrario que ambas isoformas, 2 y 8, deben tener alguna función independiente, puesto que en caso contrario el fenotipo del mutante sería complementado por alguna de las isoformas que se expresan en la raíz, en especial la ACTINA8. Sin embargo en algunos casos esto no tendría por qué suceder dado que el patrón de expresión de cada una de las isoformas no siempre es solapante. En el año 1996, An y col. realizaron un estudio del patrón de expresión de la ACTINA2 mediante una fusión de su promotor endógeno con el gen reportero GUS (An y col., 1996). En base a este trabajo podemos concluir que el fenotipo de torsión del mutante *wavy* se observa en todos los órganos en los que se expresa la ACTINA2. En este trabajo se estudiaron además las diferencias en los niveles de expresión entre las isoformas 2 y 8 y se observó que la principal diferencia radica en que la ACTINA2 apenas se expresa en polen, mientras que si lo hace la ACTINA8 (An y col., 1996). Puede que en la raíz estas tres isoformas estén compitiendo y se compensen los niveles entre ellas. De esta forma solo se ve el fenotipo del mutante en el caso de que los niveles de ACTINA2 mutada sean altos, lo que se establece en el caso del cruzamiento entre una línea portadora de un alelo nulo para el gen de la ACTINA2 y el mutante *actin2-2* que origina una planta heterocigota portadora exclusivamente de copias mutadas para la ACTINA2. Incluso en estas condiciones solo se aprecia el fenotipo del mutante en el 50% de los casos que demuestra que existe un problema de penetrancia del alelo *actin2-2*.

En la mutación *wavy*, el cambio puntual de una Arg a una Cys puede estar provocando un cambio conformacional en la estructura de la proteína ACTINA2 que mimetiza el cambio que sucede cuando se produce la activación de la respuesta de choque de la raíz. Cuando se produce la activación de esta respuesta en el mutante, éste es aún capaz de duplicar la intensidad del fenotipo. Estos resultados nos sugieren que el fenotipo de la raíz de *actin2-2* es independiente del de la ruta de choque o que las plantas están predeterminadas para activar la respuesta incrementando la intensidad del fenotipo. La participación de las otras isoformas de actina en el fenotipo de choque del mutante *wavy* parece poco probable ya que no se encontraron variaciones en los niveles de expresión entre las isoformas durante la respuesta de choque. Es decir, el mutante *actin2-2* en primer lugar no tiene alterados los niveles de expresión de la ACTINA2 ni en cuanto a número de copias de ARN mensajero ni de proteína. Asimismo la expresión de las ACTINAS 7 y 8 tampoco aumenta para compensar el efecto de la mutación, y,

por último tampoco se observan cambios en el balance de actinas de raíz cuando se produce la activación de la respuesta de choque. Asimismo, los dobles mutantes *act7(KO)/actin2-2* y *act8(KO)/actin2-2* no modifican el fenotipo exagerado de choque del mutante *wavy* lo que indica que estas isoformas no participan en el fenotipo de choque de *actin2-2*. Por otro lado hemos demostrado que la droga despolimerizante de actina, citD y el estabilizador de microtúbulos taxol alteran el fenotipo *wavy* del mutante mientras que no afectan el de las plantas silvestres sometidas a choque. Todas estas observaciones indican que el fenotipo *wavy* del mutante *actin2-2* no se debe a un fenómeno de compensación por parte de las otras isoformas sino que es la mutación per se la responsable. Además este fenotipo parece a pesar de su similitud, al menos parcialmente independiente del que muestran las plantas silvestres sometidas a choque.

El fenotipo de la parte aérea del mutante *actin2-2* es muy similar al de los mutantes alterados en la ruta de señalización de las hormonas BS. Además se sabe que el mutante *rop2-DN* afectado en la polimerización de actina exhibe un fenotipo en las hojas muy similar al del mutante *rot3 (rotundifolia 3)* alterado en el citocromo P450 que participa directamente en la síntesis de los BS (Kim y col., 1998). Por tanto, los mutantes *rop2-DN* desarrollan fenotipos de pérdida de dominancia apical del tallo y tamaños y pesos reducidos que son muy semejantes a los observados en los mutantes de síntesis o insensibles a los BS (Clouse y col., 1996; Fujioka y col., 1997; Schumacher y Chory, 2000). Se sabe que los BS aumentan la longitud del hipocotilo en presencia de baja intensidad de luz, pues bien, las plantas *rop2-DN* se comportan como insensibles a la adición de hormona (Li y col., 2001). Estos datos sugieren que existe una conexión entre ROP2, actina y BS.

La ruta de señalización de BS está muy bien caracterizada. Esta ruta se activa cuando las moléculas de hormona BS entran en contacto con el receptor de membrana BRI1 (Li y Chory, 1997; Vert y col., 2005). La interacción de los BS con el receptor BRI1 activa una cascada de transducción que provoca la defosforilación de dos factores transcripcionales BES1 (BRI1 EMS SUPPRESSOR 1) (Yin y col., 2002) y BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1) (Wang y col., 2002) que viajan al núcleo para activar la expresión de los genes efectores de la respuesta. Se sabe que ambos factores de transcripción participan en rutas independientes (Vert y col., 2005). Así BES1 interacciona con el regulador positivo BIM1 (BINDING TO MICROTUBULES 1) y

esta unión en los promotores de los genes favorece la expresión de los genes de respuesta a BS, mientras que BZR1 induce la expresión de los genes que controlan la síntesis de BS y establece un control de la ruta por retroalimentación negativa (Vert y col., 2005). Los BS se han relacionado con procesos de torsión y elongación asociados a respuestas gravitrópicas y fototrópicas (Meudt, 1987; Whippon y Hangarter, 2005; Nakamoto y col., 2006; Kim y col., 2007). Los mutantes alterados en la señalización de BS presentan hojas basales y caulinares retorcidas (Clouse y col., 1996; Choe y col., 1999; Li y col., 2001; Li y col., 2002; Nam y Li, 2002). Así por ejemplo el mutante de respuesta constitutiva *bzr1-ID* desarrolla hojas caulinares con una torsión similar al mostrado por el mutante *actin2-2* y sus hipocotilos detiolados manifiestan también un fenotipo muy semejante al de *wavy* (Wang y col., 2002). La sobre-expresión del alelo mutado *bzr1-ID* (Wang y col., 2002) provoca alteraciones en la parte aérea de torsión de órganos y crecimiento del tallo similares a los del mutante *actin2-2*. Se sabe que el mutante *bzr1-ID* presenta una activación constitutiva de la ruta de señalización de los BS (Wang y col., 2002). Por lo tanto, la semejanza fenotípica existente entre los mutantes *actin2-2* y *bzr1-ID* sugiere que en el mutante *actin2-2* podría estar activada de manera constitutiva la ruta de señalización mediada por el factor de transcripción BZR1. Resulta relevante el hecho de que los mutantes *bzr1-ID* y *bes1-ID*, ambos de respuesta constitutiva, presenten respuestas fotomorfogénicas diferentes. El mutante *bzr1-ID* en oscuridad es insensible al inhibidor de síntesis de BS brasinazol (BSZ) y en luz presenta una reducida elongación celular, niveles bajos de BS y poca expresión del gen CPD, regulador positivo de la ruta de síntesis de BS. Sin embargo *bes1-ID* es hipersensible a los BS en oscuridad y en luz (Wang y col., 2002; Yin y col., 2002). Por el contrario, el mutante *actin2-2*, se comporta como una planta silvestre en todas las respuestas fototrópicas analizadas. Así por ejemplo el tratamiento con BSZ inhibe la elongación del hipocotilo en oscuridad tanto en plantas silvestres como en el mutante *actin2-2* lo que indica que el mutante no tiene alterada esta respuesta. Sin embargo, un análisis proteómico de la respuesta a BS demuestra que el aporte exógeno de esta hormona incrementa los niveles de ACTINA2 indicando que existe una relación entre la ACTINA2 y los BS (Deng y col., 2007).

En este trabajo hemos demostrado que las raíces de las plantas silvestres en presencia de BS desarrollan un fenotipo de torsión similar al del mutante *actin2-2*. Asimismo, hemos observado que el tratamiento con vanadato, un inhibidor de fosfatasa

que altera el patrón de fosforilación de actinas (Kameyama y col., 2000), inhibe este fenotipo de torsión tanto el de las plantas silvestres tratadas con BS como el del mutante *actin2-2* lo que sugiere que el patrón de fosforilación es esencial en ambas respuestas e indica que ambos fenotipos están relacionados. Como hemos mencionado, la ruta de señalización de BS está regulada por procesos de fosforilación de manera que los factores de transcripción BZR1 y BES, activadores de la ruta, deben estar defosforilados para que viajen al núcleo y activen los genes de respuesta a BS (Wang y col., 2002; Yin y col., 2002). Si estas proteínas se encuentran fosforiladas son inmediatamente captadas por el proteosoma y se procede a su degradación (He y col., 2002). Cuando se añade el vanadato se impide la defosforilación y con ello no es de extrañar que este tratamiento inhiba la ruta de los BS, impidiendo el fenotipo característico en la raíz de las plantas Col tratadas con BS. Por otro lado, el tratamiento con vanadato también impide el fenotipo del mutante *actin2-2* lo que sugiere que la fosforilación también es importante para el desarrollo de este fenotipo. De hecho la respuesta de torsión característica de *Mimosa pudica* no sucede en presencia de inhibidores de fosfatasa ya que el inhibidor altera el patrón de fosforilación de la actina esencial para su capacidad de polimerización en la formación de los haces (Kameyama y col., 2000). Bien sea por alteración del grado de fosforilación de BES o BZR o de las isoformas de actina o ambas cosas a la vez es evidente que estos fenotipos se inhiben tras la adición de vanadato, lo que indica fuertemente que los fenotipos del mutante y el de la respuesta a BS son similares.

Durante el desarrollo de este trabajo hemos demostrado que esta no es la única respuesta a BS que tiene activado el mutante de forma constitutiva. Los datos mostrados en este trabajo indican que otras respuestas características de BS como el incremento en la velocidad de respuesta a graviestimulación y la polarización del transportador de AUXs PIN2 asociada a esta respuesta (Li y col., 2005) aparecen también constitutivas en las plantas *actin2-2* y además este patrón constitutivo no se ve alterado en presencia de BS. En este sentido se sabe que la droga despolimerizante de actina latB es capaz de acelerar la respuesta a graviestimulación (Hou y col., 2004) confirmando la implicación de la actina en esta respuesta. Por tanto, estos resultados sugieren que existe una relación entre la actina, y el papel de los BS en graviestimulación. Es bien conocido que durante los fenómenos de torsión que sufre la raíz para reorientar su crecimiento en el sentido del vector gravitatorio conllevan fenómenos de elongación celular diferencial

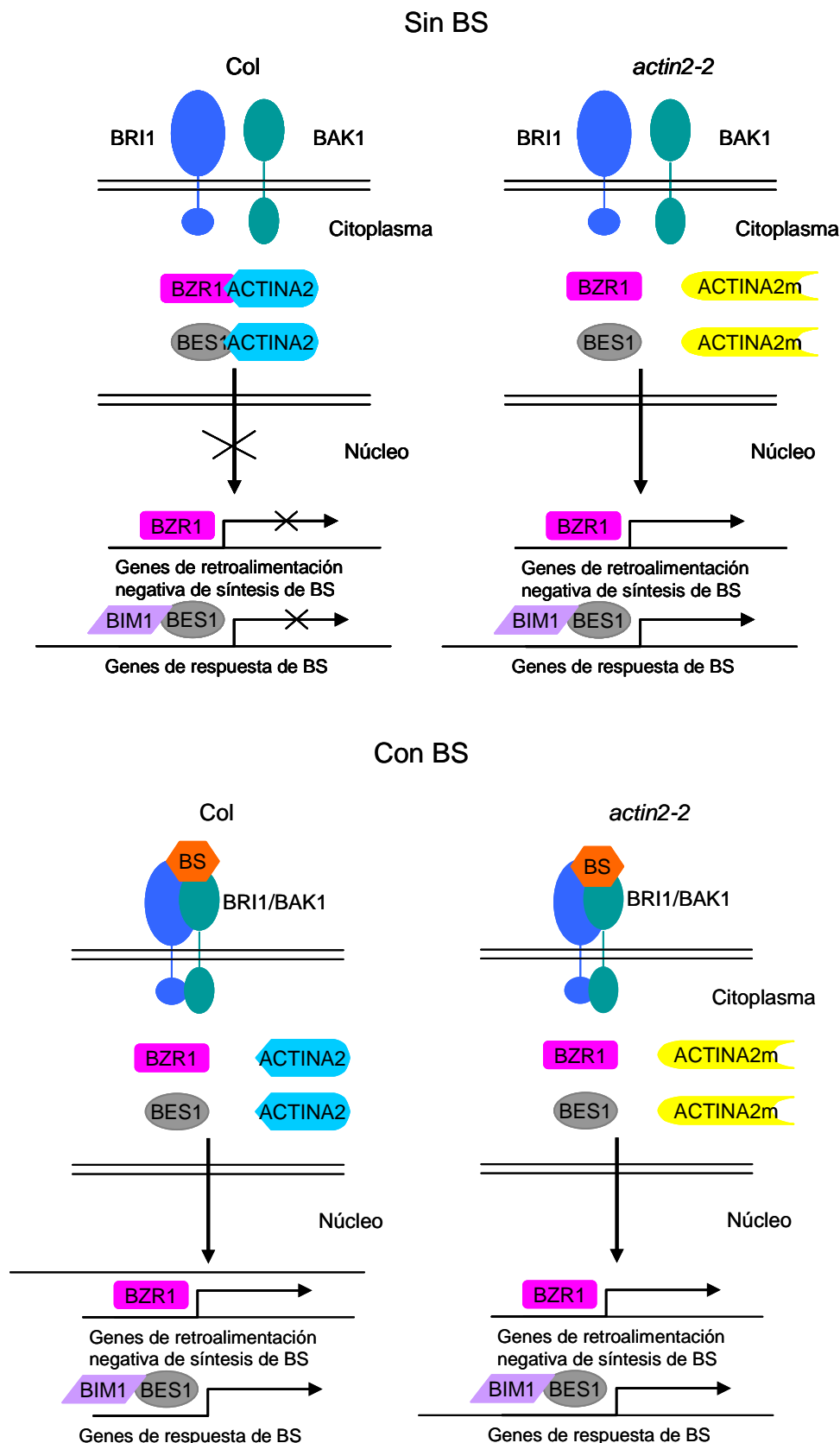


que están controlados por cambios en los gradientes de AUXs (Plieth y Trewavas, 2002; Boonsirichai y col., 2003; Mussig y col., 2003; Buer y Muday, 2004; Esmon y col., 2006; Wisniewska y col., 2006). Es lógico por tanto pensar que la acumulación de AUXs en determinadas zonas de la raíz este mediada por la localización del transportador. Asimismo, se conoce que estos transportadores se localizan a través de vesículas que se transportan utilizando el citosqueleto del que forma parte la actina (Li y col., 2005; Boutte y col., 2006; Kleine-Vehn y col., 2006). Hoy en día se conoce que los BS inducen la síntesis y liberación de AUXs en los lugares de respuesta (Sabatini y col., 1999). Por ejemplo, se ha visto que los BS controlan la localización de AUXs en los puntos de formación de raíces laterales incrementando su número (Bao y col., 2004). En este trabajo, utilizando una línea transgénica portadora de una construcción DR5-GUS que marca las zonas de acumulación de AUXs hemos observado que los BS incrementan el número de inicios de raíces laterales en plantas silvestres mientras que en el mutante existe un mayor número de inicios en plantas sin tratar y además este número no se ve alterado en presencia de la hormona. Por tanto, el mutante *actin2-2* es un mutante insensible a BS respecto a las respuestas de crecimiento ondulado de la raíz, incremento de la velocidad de respuesta a graviestimulación, localización polar del transportador de AUXs, PIN2 e incremento del número de inicios de raíces laterales. Todas estas observaciones indican que la ACTINA2 participa en la localización del transportador de AUXs siendo responsable de la acumulación de esta hormona en las zonas de máxima elongación de la raíz generando un proceso de torsión, todo ello mediado por BS. Es sorprendente que el fenotipo constitutivo de todas estas respuestas se hayan observado en un mutante de un gen estructural como la actina.

Recientemente se ha demostrado un mecanismo de regulación de la expresión génica mediada por actina. En células animales se sabe que los monómeros de actina participan en el control del transporte de factores de transcripción entre el citoplasma y el núcleo y de esta forma regulan la activación o represión de la expresión génica (Miralles y col., 2003; Miralles y Visa, 2006). Tal es el caso del factor de transcripción MAL (MYOCARDIN-RELATED SRF COACTIVATOR). Esta proteína se une a la forma globular (monomérica) de la actina y queda secuestrada en el citoplasma. Cuando la actina se requiere para la formación de haces para alterar la morfología de las células animales el factor de transcripción MAL se libera, viaja al núcleo y activa la expresión génica (Miralles y col., 2003; Posern y col., 2004).

En el caso de la ruta de señalización de los BS los factores transcripcionales BZR1 y BES1 se defosforilan en respuesta a BS transportándose donde activan la transcripción de los genes. En este contexto, la ACTINA2 podría participar en el transporte de BZR1 o de BES1 al núcleo, posibilitando su unión a los promotores para que se produzca la activación de los genes (Fig. 30). En condiciones normales estos factores de transcripción pueden quedar secuestrados por los monómeros de ACTINA2 en el citoplasma en ausencia de hormona; y en el mutante la ACTINA2 mutada sería incapaz de unir dichos factores de transcripción debido al cambio conformacional derivado de la mutación *wavy* y de esta forma los factores de transcripción BES1 y BZR1 estarían en el núcleo continuamente activando la ruta al parecer saturándola ya que *actin2-2* se comporta como insensible a la adición de BS (Fig. 30).

Otra posibilidad es que la ACTINA2 mutada esté impidiendo la destrucción de BZR1 o BES1 en el proteosoma con lo que el exceso de estas proteínas estaría activando continuamente la respuesta en el núcleo. Para comprobar este modelo en la actualidad se están llevando a cabo en el laboratorio experimentos de co-inmunoprecipitación entre la ACTINA y BES1 y BZR1. Al mismo tiempo como se conoce que las proteínas BZR1 y BES1 defosforiladas viajan al núcleo (He y col., 2002; Wang y col., 2002; Yin y col., 2002) se están haciendo estudios para determinar el estado de fosforilación de estos factores de transcripción en el fondo mutante *wavy*. Asimismo, en estos últimos meses se ha estado realizando una identificación de mutantes supresores del fenotipo mutante *actin2-2*. El mapeo cromosómico de dicha población permitirá ir desenmascarando nuevos componentes de la ruta de señalización de BS mediada por la proteína ACTINA2 en *Arabidopsis*. Otro frente abierto en el laboratorio se encarga de comparar mediante geles de dos dimensiones el patrón de migración de las isoformas de actina en el mutante *actin2-2* y en las plantas Col tratadas con hormonas BS. Con este experimento se pretende confirmar que la conformación que adopta la ACTINA2 en el mutante es similar a la que ocurre en la ACTINA2 silvestre tratada con BS. Con estos resultados esperamos poder obtener los primeros indicios de los mecanismos moleculares implicados en la ruta de señalización de los BS mediados por ACTINA2.



**Figura 30. Modelo de secuestro de BZR1 y BES mediado por la ACTINA2.** Este modelo propone el secuestro citoplasmático de los factores de transcripción BES y BZR por parte de la ACTINA2 en ausencia de BS. En las plantas Col la ACTINA2 se uniría a dichas proteínas impidiendo la transcripción de los genes de la ruta de los BS. En presencia de BS, por el contrario, BES y BZR se liberarían y activarían la transcripción. Sin embargo en las plantas mutantes, la proteína mutada *actin2-2* sería incapaz de secuestrar a BES y BZR en el citoplasma y se estaría activando de forma constitutiva la ruta de señalización de los BS independientemente a la adición de la hormona.

En resumen, en esta tesis se ha caracterizado una nueva mutación en el gen que codifica para la ACTINA2 que ha permitido implicar por primera vez a esta proteína con los procesos de torsión mediados por la ruta de señalización de las hormonas BS. En el mutante *actin2-2* se ha confirmado la insensibilidad a los BS y su comportamiento similar al de un mutante de activación constitutiva de la ruta de señalización de esta hormona. Los experimentos de inmunoprecipitación y del estudio del grado de fosforilación de los factores de transcripción BES1 y BZR1 permitirán averiguar si la ACTINA2 participa en su regulación y, en caso afirmativo, aportarán una nueva función a esta proteína en plantas.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. La dominancia apical es un factor preponderante en la conversión de una AR pivotante en fasciculada. Dado que existe un patrón determinado de desarrollo que impide la formación de raíces secundarias hasta que la principal no alcanza una determinada longitud la pérdida completa de dominancia apical condiciona la supervivencia de la planta a la generación de raíces adventicias.
2. El patrón de desarrollo de la raíz principal es condicionada a la correcta formación del embrión siendo éste independiente de la correcta formación de raíces laterales y adventicias.
3. Los mutantes *raw2* y *raw3* reflejan una marcada insensibilidad a CQs por lo que la identificación de los genes alterados permitirá conocer dos componentes nuevos de la ruta de señalización de dichas hormonas.
4. Al igual que otros mutantes insensibles a CQs, los mutantes *raw2* y *raw3* presentan alteraciones en el desarrollo de tejido vascular. El mutante *raw2* es incapaz de desarrollar un xilema maduro y *raw3* tiene un defecto de identidad tisular y desarrolla xilema en las células del floema; además este mutante tiene afectada la vascularización secundaria y por tanto la identificación de estos genes podría arrojar nuevos datos del papel de las citoquininas en este proceso.
5. El gen *RAW2* se encuentra acotado en la región del cromosoma III que contiene 41 genes entre los BACs T6D9 y F12M12 y el gen *RAW3* en la zona del cromosoma I comprendida entre los marcadores *nga280* y *nga111*.
6. El mutante *wavy* se aisló en base a sus alteraciones constitutivas en los fenotipos de torsión que abarcan tanto la parte aérea como la raíz. La raíz del mutante *wavy* mimetiza la respuesta de choque de una planta Col.
7. La mutación *wavy* se debe a un cambio puntual de una Adenina por una Timina en el segundo exón del gen que codifica para la proteína ACTINA2 y este cambio se traduce en la aparición de una Cys en el lugar de la Arg 179 en la secuencia aminoacídica que probablemente lleve a la reorganización de su estructura terciaria. A partir de este momento el mutante se denominó *actin2-2*.
8. La similitud de fenotipos de raíz en el mutante *actin2-2* y en las plantas sometidas a impedimento mecánico no son pruebas suficientes para establecer una relación definitiva. Los experimentos de adición de drogas de citoesqueleto

indican que la respuesta de choque es un mecanismo de torsión al menos parcialmente independiente al que sucede en la raíz del mutante *actin2-2*.

9. Los estudios de expresión de las proteínas actinas no muestran indicios de compensación ni en el mutante *actin2-2* ni en la respuesta de tigmogénesis.
10. El mutante *actin2-2* desarrolla un fenotipo semejante en la raíz al que experimenta una planta silvestre sometida a la adición de hormonas BS.
11. La insensibilidad de *actin2-2* a las hormonas BS, la aceleración de la respuesta gravitrópica y la localización basipétala de los transportadores PIN2 en el mutante y el patrón de marcaje GUS en las plantas mutantes y tratadas con BS indican que la ACTINA2 participa en la ruta de señalización de estas hormonas.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W y Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Allen, Moore y Christensen** (1980) Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular–arbuscular mycorrhizae. *Can. J. Bot.* **58**: 371-374
- Allona I, Quinn M, Shoop E, Swope K, St Cyr S, Carlis J, Riedl J, Retzel E, Campbell MM, Sederoff R y Whetten RW** (1998) Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9693-9698
- An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S y Meagher RB** (1996) Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J* **10**: 107-121
- Ang LH, Chattopadhyay S, Wei N, Oyama T, Okada K, Batschauer A y Deng XW** (1998) Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol Cell* **1**: 213-222
- Antosiewicz DM, Polisensky DH y Braam J** (1995) Cellular localization of the Ca<sup>2+</sup> binding TCH3 protein of Arabidopsis. *Plant J* **8**: 623-636
- Baima S, Possenti M, Matteucci A, Wisman E, Altamura MM, Ruberti I y Morelli G** (2001) The arabidopsis ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol* **126**: 643-655
- Balestrini R, Cosgrove DJ y Bonfante P** (2005) Differential location of alpha-expansin proteins during the accommodation of root cells to an arbuscular mycorrhizal fungus. *Planta* **220**: 889-899
- Balestrini R, Hahn MG, Faccio A, Mendgen K y Bonfante P** (1996) Differential Localization of Carbohydrate Epitopes in Plant Cell Walls in the Presence and Absence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiol* **111**: 203-213
- Baluska F, Salaj J, Mathur J, Braun M, Jasper F, Samaj J, Chua NH, Barlow PW y Volkmann D** (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Dev Biol* **227**: 618-632
- Bao F, Shen J, Brady SR, Muday GK, Asami T y Yang Z** (2004) Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**: 1624-1631
- Bao Y, Kost B y Chua NH** (2001) Reduced expression of alpha-tubulin genes in Arabidopsis thaliana specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *Plant J* **28**: 145-157
- Barlow** (2003) The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function. *J. Plant Growth Regul* **21**
- Barlow PW** (1992) A conceptual framework for investigating plant growth movements, with special reference to root gravitropism, utilizing a microgravity environment. *Microgravity Q* **2**: 77-87
- Bates T.R. y Lynch JP** (1996) Stimulation of root hair elongation in Arabidopsis thaliana by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ.* **19**: 529-538
- Bechtold N y Pelletier G** (1998) In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**: 259-266

- Beebe, Rojas-Piercea, Yanb, Blair, Pedrazac, Muñoz, Tohmea y Lynche** (2006) Quantitative Trait Loci for Root Architecture Traits Correlated with Phosphorus Acquisition in Common Bean Crop Sci **46**: 413-423
- Blakely LMy** (1982) Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots. I. General methods, developmental stages and spontaneous formation of laterals. Bot. Gaz. **143**: 341-352
- Blancaflor EB, Fasano JM y Gilroy S** (1998) Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. Plant Physiol **116**: 213-222
- Bloom AJ, Chapin, F.S. III y Mooney, H.A.** (1985) Resource limitation in plants-an economic analogy. Annu Rev Ecol Syst **16**: 363-392
- Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M y Inze D** (1995) Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. Plant Cell **7**: 1405-1419
- Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M y Benning C** (1998) AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. Embo J **17**: 170-180
- Bonke M, Thitamadee S, Mahonen AP, Hauser MT y Helariutta Y** (2003) APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. Nature **426**: 181-186
- Bonser AM, Lynch J y Snapp S** (1996) Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in Phaseolus vulgaris. New Phytol **132**: 281-288
- Boonsirichai K, Sedbrook JC, Chen R, Gilroy S y Masson PH** (2003) ALTERED RESPONSE TO GRAVITY is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes. Plant Cell **15**: 2612-2625
- Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M y Arteca RN** (1996) Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (Vigna radiata). Plant Mol Biol **30**: 1129-1137
- Botella JR y Arteca RN** (1994) Differential expression of two calmodulin genes in response to physical and chemical stimuli. Plant Mol Biol **24**: 757-766
- Boutte Y, Crosnier MT, Carraro N, Traas J y Satiat-Jeunemaitre B** (2006) The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins. J Cell Sci **119**: 1255-1265
- Bowman JL** (2004) Class III HD-Zip gene regulation, the golden fleece of ARGONAUTE activity? Bioessays **26**: 938-942
- Braam J** (1992) Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured Arabidopsis cells: induction by calcium and heat shock. Proc Natl Acad Sci U S A **89**: 3213-3216
- Braam J** (2000) The Arabidopsis TCH genes: Regulated in expression by mechanotransduction?, Vol 83. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands
- Braam J** (2005) In touch: plant responses to mechanical stimuli. New Phytol **165**: 373-389
- Braam J y Davis RW** (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in Arabidopsis. Cell **60**: 357-364
- Brinker M, van Zyl L, Liu W, Craig D, Sederoff RR, Clapham DH y von Arnold S** (2004) Microarray analyses of gene expression during adventitious root development in Pinus contorta. Plant Physiol **135**: 1526-1539

- Buer CS y Muday GK** (2004) The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light. *Plant Cell* **16**: 1191-1205
- Buer CS, Wasteneys GO y Masle J** (2003) Ethylene modulates root-wave responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **132**: 1085-1096
- Cannon** (1911) *The Root Habits of Desert Plants*. DC, Washington
- Cano-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-Garcia S, Cheng JC, Nam KH, Li J y Chory J** (2004) BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development* **131**: 5341-5351
- Cano-Delgado AI, Metzlaff K y Bevan MW** (2000) The eli1 mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in Arabidopsis thaliana. *Development* **127**: 3395-3405
- Carlsbecker A y Helariutta Y** (2005) Phloem and xylem specification: pieces of the puzzle emerge. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 512-517
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G y Bennett MJ** (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci* **8**: 165-171
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inze D, Sandberg G, Casero PJ y Bennett M** (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* **13**: 843-852
- Catterou M, Dubois F, Schaller H, Aubanelle L, Vilmot B, Sangwan-Norreel BS y Sangwan RS** (2001) Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in Arabidopsis thaliana. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the bull1 mutant. *Planta* **212**: 673-683
- Celenza JL, Jr., Grisafi PL y Fink GR** (1995) A pathway for lateral root formation in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* **9**: 2131-2142
- Clouse SD** (2002) Brassinosteroid signaling: novel downstream components emerge. *Curr Biol* **12**: R485-487
- Clouse SD, Langford M y McMorris TC** (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* **111**: 671-678
- Conrath U, Pieterse CM y Mauch-Mani B** (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* **7**: 210-216
- Correll MJ, Coveney KM, Raines SV, Mullen JL, Hangarter RP y Kiss JZ** (2003) Phytochromes play a role in phototropism and gravitropism in Arabidopsis roots. *Adv Space Res* **31**: 2203-2210
- Correll MJ y Kiss JZ** (2005) The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Physiol* **46**: 317-323
- Chaffey N, Cholewa E, Regan S y Sundberg B** (2002) Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. *Physiol Plant* **114**: 594-600
- Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M y Deng XW** (1996) The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* **86**: 115-121
- Chen M, Chory J y Fankhauser C** (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* **38**: 87-117
- Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T y Masson PH** (1998) The arabidopsis thaliana AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15112-15117

- Chloupek O, Forster BP y Thomas WT** (2006) The effect of semi-dwarf genes on root system size in field-grown barley. *Theor Appl Genet* **112**: 779-786
- Choe S, Dilkes BP, Gregory BD, Ross AS, Yuan H, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE y Feldmann KA** (1999) The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* **119**: 897-907
- Church GM y Gilbert W** (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1991-1995
- Darwin** (1880) *The Power of Movement in Plants*,
- de Dorlodot S, Forster B, Pages L, Price A, Tuberosa R y Draye X** (2007) Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci* **12**: 474-481
- de Leon BG, Zorrilla JM, Rubio V, Dahiya P, Paz-Ares J y Leyva A** (2004) Interallelic complementation at the *Arabidopsis* CRE1 locus uncovers independent pathways for the proliferation of vascular initials and canonical cytokinin signalling. *Plant J* **38**: 70-79
- De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frey NF, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, Inze D, Bennett MJ y Beeckman T** (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* **134**: 681-690
- Dejardin A, Leple JC, Lesage-Descauses MC, Costa G y Pilate G** (2004) Expressed sequence tags from poplar wood tissues--a comparative analysis from multiple libraries. *Plant Biol (Stuttg)* **6**: 55-64
- Delarue M, Prinsen E, Onckelen HV, Caboche M y Bellini C** (1998) Sur2 mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant J* **14**: 603-611
- Dellaporta S. L. WJyHJB** (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep.* **1**: 19-21
- Demura T y Fukuda H** (2007) Transcriptional regulation in wood formation. *Trends Plant Sci* **12**: 64-70
- Deng Z, Zhang X, Tang W, Oses-Prieto JA, Suzuki N, Gendron JM, Chen H, Guan S, Chalkley RJ, Peterman TK, Burlingame AL y Wang ZY** (2007) A proteomics study of brassinosteroid response in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics* **6**: 2058-2071
- Deruere J, Jackson K, Garbers C, Soll D y Delong A** (1999) The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo. *Plant J* **20**: 389-399
- Díaz-Sala, KW H, B G y S G** (1996) Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: the role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. *Physiol Plant* 481-490
- Diet A, Brunner S y Ringli C** (2004) The *enl* mutants enhance the *lrx1* root hair mutant phenotype of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**: 734-741
- Dinneny JR y Yanofsky MF** (2004) Vascular patterning: xylem or phloem? *Curr Biol* **14**: R112-114
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H y Kawakita K** (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review. *Gene* **179**: 45-51

- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K y Scheres B** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71-84
- Drew** (1975) Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytology* **75**: 479-490
- Eapen D, Barroso ML, Campos ME, Ponce G, Corkidi G, Dubrovsky JG y Cassab GI** (2003) A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**: 536-546
- Eapen D, Barroso ML, Ponce G, Campos ME y Cassab GI** (2005) Hydrotropism: root growth responses to water. *Trends Plant Sci* **10**: 44-50
- Ehlting J, Mattheus N, Aeschliman DS, Li E, Hamberger B, Cullis IF, Zhuang J, Kaneda M, Mansfield SD, Samuels L, Ritland K, Ellis BE, Bohlmann J y Douglas CJ** (2005) Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *Plant J* **42**: 618-640
- Eldick G, Jv Ruiter, RK., Colla, PHWN., Herpen, MM., Av Schrauwen, JAM., Wullems, GJ. .:** (1997) Expression of an isoflavone reductase-like gene enhanced by pollen tube growth in pistils of *Solanum tuberosum*. *Plant Molecular Biology* **33**: 923-929
- Elkind Y, Edwards R, Mavandad M, Hedrick SA, Ribak O, Dixon RA y Lamb CJ** (1990) Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9057-9061
- Esmon CA, Tinsley AG, Ljung K, Sandberg G, Hearne LB y Liscum E** (2006) A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 236-241
- Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C y Vaucheret H** (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11650-11654
- Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao TH y Gilroy S** (2001) Changes in root cap pH are required for the gravity response of the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **13**: 907-921
- Fester T, Strack D y Hause B** (2001) Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* **213**: 864-868
- Fett-Neto AG, Fett JP, Veira Goulart LW, Pasquali G, Termignoni RR y Ferreira AG** (2001) Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol* **21**: 457-464
- Flores HE, Vivanco JM y Loyola-Vargas VM** (1999) 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci* **4**: 220-226
- Foucart C, Paux E, Ladouce N, San-Clemente H, Grima-Pettenati J y Sivadon P** (2006) Transcript profiling of a xylem vs phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xylogenesis in *Eucalyptus*. *New Phytol* **170**: 739-752
- Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jurgens G y Palme K** (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 661-673

- Fu Y, Wu G y Yang Z** (2001) Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol* **152**: 1019-1032
- Fu Y y Yang Z** (2001) Rop GTPase: a master switch of cell polarity development in plants. *Trends Plant Sci* **6**: 545-547
- Fujioka S, Li J, Choi YH, Seto H, Takatsuto S, Noguchi T, Watanabe T, Kuriyama H, Yokota T, Chory J y Sakurai A** (1997) The Arabidopsis deetiolated2 mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **9**: 1951-1962
- Fukaki H, Wysocka-Diller J, Kato T, Fujisawa H, Benfey PN y Tasaka M** (1998) Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **14**: 425-430
- Fukuda H** (2004) Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 379-391
- Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suzuki K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T y Hashimoto T** (2000) The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in Arabidopsis thaliana. *Development* **127**: 4443-4453
- Garrigues, Doussan y Pierret** (2006) Water Uptake by Plant Roots: I – Formation and Propagation of a Water Extraction Front in Mature Root Systems as Evidenced by 2D Light Transmission Imaging *Plant and Soil* **283**: 83-98
- Gawienowski M, Szymanski, D., Perera, IY., Zielinski, RE.** (1993) Calmodulin isoforms in Arabidopsis encoded by multiple divergent mRNAs. *Plant Molecular Biology* **22**: 215-225
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM y Thomashow MF** (1998) Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J* **16**: 433-442
- Gilliland LU, Kandasamy MK, Pawloski LC y Meagher RB** (2002) Both vegetative and reproductive actin isoforms complement the stunted root hair phenotype of the Arabidopsis act2-1 mutation. *Plant Physiol* **130**: 2199-2209
- Gilliland LU, Pawloski LC, Kandasamy MK y Meagher RB** (2003) Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. *Plant J* **33**: 319-328
- Gleave AP** (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* **20**: 1203-1207
- Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY y Raskin I** (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5973-5977
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S y Yoshida S** (2002) Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**: 1319-1334
- Goldfarb, WP H, GR F, CA M y A P** (1998) Adventitious root initiation in hypocotyls and epicotyl cuttings of eastern white pine (Pinus strobes) seedlings. *Physiol Plant* **513**-522
- Gregory, Hutchison, Read, Jenneson, Gilboy y Morton** (2003) Non-invasive imaging of roots with high resolution X-ray micro-tomography. *Plant and Soil* **255**: 351-359 (359)
- Groover AT** (2005) What genes make a tree a tree? *Trends Plant Sci* **10**: 210-214
- Gu Y, Wang Z y Yang Z** (2004) ROP/RAC GTPase: an old new master regulator for plant signaling. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 527-536

- Guerinot ML y Yi Y** (1994) Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiol* **104**: 815-820
- Han, H B y M G** (1994) Adventitious root and shoot regeneration in vitro is under major gene control in an F2 family of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*). *For Genet* **1**: 139-146
- Hans J, Hause B, Strack D y Walter MH** (2004) Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize. *Plant Physiol* **134**: 614-624
- Hashimoto T** (2002) Molecular genetic analysis of left-right handedness in plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 799-808
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R y Strack D** (2002) Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol* **130**: 1213-1220
- He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J y Wang ZY** (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10185-10190
- Hirsinger C, Salva, I., Marbach, J., Durr, A., Fleck, J., Jamet, E.** (1999) The tobacco extensin gene Ext 1.4 is expressed in cells submitted to mechanical constraints and in cells proliferating under hormone control. *Journal of Experimental Botany* **50**: 343-355
- Holm M, Ma LG, Qu LJ y Deng XW** (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev* **16**: 1247-1259
- Hou G, Kramer VL, Wang YS, Chen R, Perbal G, Gilroy S y Blancaflor EB** (2004) The promotion of gravitropism in Arabidopsis roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalization of the columella cytoplasm and a persistent lateral auxin gradient. *Plant J* **39**: 113-125
- Hou G, Mohamalawari DR y Blancaflor EB** (2003) Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. *Plant Physiol* **131**: 1360-1373
- Hwang I, Chen HC y Sheen J** (2002) Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**: 500-515
- Hwang I y Sheen J** (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* **413**: 383-389
- Ingrouille** (1992) Diversity and Evolution of Land Plants,
- Inoue H, Nojima H y Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K y Kakimoto T** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* **409**: 1060-1063
- Jaffe MJ, Takahashi H y Biro RL** (1985) A Pea Mutant for the Study of Hydrotropism in Roots. *Science* **230**: 445-447
- Jakab Gyc** (2001) B-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 29-37
- Jang IC, Yang JY, Seo HS y Chua NH** (2005) HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev* **19**: 593-602

- Johannes E, Collings DA, Rink JC y Allen NS** (2001) Cytoplasmic pH dynamics in maize pulvinal cells induced by gravity vector changes. *Plant Physiol* **127**: 119-130
- Jonassen EM, Lea US y Lillo C** (2008) HY5 and HYH are positive regulators of nitrate reductase in seedlings and rosette stage plants. *Planta* **227**: 559-564
- Jones-Rhoades MW y Bartel DP** (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* **14**: 787-799
- Jones L, Ennos AR y Turner SR** (2001) Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. *Plant J* **26**: 205-216
- Jones MA, Shen JJ, Fu Y, Li H, Yang Z y Grierson CS** (2002) The Arabidopsis Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell* **14**: 763-776
- Kakimoto T** (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 605-627
- Kameyama K, Kishi Y, Yoshimura M, Kanzawa N, Sameshima M y Tsuchiya T** (2000) Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* **407**: 37
- Kamoshita A, Wade J, Ali L, Pathan S, Zhang J, Sarkarung S y Nguyen T** (2002) Mapping QTLs for root morphology of a rice population adapted to rainfed lowland conditions. *Theor Appl Genet* **104**: 880-893
- Kamoshita A, Zhang J, Siopongco J, Sarkarung S, Nguyen HT y Wade LJ** (2002) Effects of Phenotyping Environment on Identification of Quantitative Trait Loci for Rice Root Morphology under Anaerobic Conditions. *Crop Sci* **42**: 255-265
- Karpinska B, Karlsson M, Srivastava M, Stenberg A, Schrader J, Sterky F, Bhalerao R y Wingsle G** (2004) MYB transcription factors are differentially expressed and regulated during secondary vascular tissue development in hybrid aspen. *Plant Mol Biol* **56**: 255-270
- Kato, Abe, Kamoshita y Yamagishi** (2006) Genotypic Variation in Root Growth Angle in Rice (*Oryza sativa* L.) and its Association with Deep Root Development in Upland Fields with Different Water Regimes *Plant and Soil* **287**: 117-129 (113)
- Khan AR, Johnson KA, Braam J y James MN** (1997) Comparative modeling of the three-dimensional structure of the calmodulin-related TCH2 protein from Arabidopsis. *Proteins* **27**: 144-153
- Kim GT, Tsukaya H y Uchimiya H** (1998) The ROTUNDIFOLIA3 gene of Arabidopsis thaliana encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Genes Dev* **12**: 2381-2391
- Kim SK, Chang SC, Lee EJ, Chung WS, Kim YS, Hwang S y Lee JS** (2000) Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize. *Plant Physiol* **123**: 997-1004
- Kim TW, Lee SM, Joo SH, Yun HS, Lee Y, Kaufman PB, Kirakosyan A, Kim SH, Nam KH, Lee JS, Chang SC y Kim SK** (2007) Elongation and gravitropic responses of Arabidopsis roots are regulated by brassinolide and IAA. *Plant Cell Environ* **30**: 679-689
- King JJ y Stimart DP** (1998) Genetic analysis of variation for auxin-induced adventitious root formation among eighteen ecotypes of Arabidopsis thaliana L. *Heynh. J Hered* **89**: 481-487



- Kircher S, Wellmer F, Nick P, Rugner A, Schafer E y Harter K** (1999) Nuclear import of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by phytochrome photoreceptors. *J Cell Biol* **144**: 201-211
- Kirst M, Johnson AF, Baucom C, Ulrich E, Hubbard K, Staggs R, Paule C, Retzel E, Whetten R y Sederoff R** (2003) Apparent homology of expressed genes from wood-forming tissues of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) with *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7383-7388
- Kiss JZ, Hertel R y Sack FD** (1989) Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **177**: 198-206
- Kiss JZ, Miller KM, Ogden LA y Roth KK** (2002) Phototropism and gravitropism in lateral roots of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **43**: 35-43
- Kiss JZ, Mullen JL, Correll MJ y Hangarter RP** (2003) Phytochromes A and B mediate red-light-induced positive phototropism in roots. *Plant Physiol* **131**: 1411-1417
- Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Swarup R, Bennett M y Friml J** (2006) Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* **18**: 3171-3181
- Klerk D, WM VDK y JC DJ** (1999) The formation of adventitious roots; new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell Dev Biol*: 189-199
- Konishi M y Sugiyama M** (2003) Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **130**: 5637-5647
- Krusell L, Madsen LH, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczyglowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, de Bruijn F, Pajuelo E, Sandal N y Stougaard J** (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* **420**: 422-426
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H y Demura T** (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev* **19**: 1855-1860
- Kuc J** (1987) Translocated signals for plant immunization. *Ann. New York Acad. Sci.* **494**: 221-223
- Kutz A, Muller A, Hennig P, Kaiser WM, Piotrowski M y Weiler EW** (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **30**: 95-106
- Laskowski MJ, Williams ME, Nusbaum HC y Sussex IM** (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* **121**: 3303-3310
- Laxmi A, Pan J, Morsy M y Chen R** (2008) Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **3**: e1510
- Lee D, Polisensky DH y Braam J** (2005) Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytol* **165**: 429-444
- Legue V, Driss-Ecole D, Maldiney R, Tepfer M y Perbal G** (1996) The response to auxin of rapeseed (*Brassica napus* L.) roots displaying reduced gravitropism due to transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Planta* **200**: 119-124
- Li H, Shen JJ, Zheng ZL, Lin Y y Yang Z** (2001) The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 670-684
- Li J y Chory J** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**: 929-938

- Li J, Nam KH, Vafeados D y Chory J** (2001) BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 14-22
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE y Walker JC** (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 213-222
- Li L, Xu J, Xu ZH y Xue HW** (2005) Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2738-2753
- Ling V, Perera, IY., Zielinski, RE.** (1991) Primary structures of *Arabidopsis* calmodulin isoforms deduced from the sequences of cDNA clones. *Plant Physiology* **96**: 1196–1202
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH y Leyser HM** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J* **29**: 751-760
- Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A y Malamy JE** (2005) The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13693-13698
- Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A y Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 280-287
- Lopez-Bucio J, Hernandez-Abreu E, Sanchez-Calderon L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J y Herrera-Estrella L** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol* **129**: 244-256
- Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P y Fink GR** (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **12**: 2175-2187
- Lynch y Brown** (1997) Ethylene and nutritional stress. *Physiol Plant* **100**: 613-619
- Lynch J** (1995) Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiol* **109**: 7-13
- Lynch J, Nielsen, K.L.** (1995) Simulation of root system architecture, New York
- Lynch J, van Beem, J.** (1993) Growth and architecture of seedling roots of common bean genotypes. *Crop. Sci.* **33**: 1253-1257
- Mahonen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Tormakangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T y Helariutta Y** (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**: 94-98
- Mahonen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN y Helariutta Y** (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* **14**: 2938-2943
- Malamy JE** (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* **28**: 67-77
- Malamy JE y Benfey PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33-44
- Malamy JE y Ryan KS** (2001) Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 899-909
- Mallory AC, Bartel DP y Bartel B** (2005) MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* **17**: 1360-1375

- Mandoli D, Ford,GA., Waldron, LJ., Nemson, JA., Briggs, WR.** (1990) Some spectral properties of several soil types: implications for photomorphogenesis. *Plant Cell Environ* **13**: 287-294
- Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C y Bennett MJ** (1999) AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *Embo J* **18**: 2066-2073
- Marques, J V-K, V C, J F, D OM, B L y R S** (1999) Genetic dissection of vegetative traits in Eucalyptus tereticornis and E. globulus. *Theor Appl Genet* **99**: 936-946
- Marquez AJ, Betti M, Garcia-Calderon M, Pal'ove-Balang P, Diaz P y Monza J** (2005) Nitrate assimilation in Lotus japonicus. *J Exp Bot* **56**: 1741-1749
- Massa GD y Gilroy S** (2003) Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **33**: 435-445
- Mauch F, Knecl A, Schaffrath U, Volrath S, Grolach J, Ward E, Ryals J y Dudler R** (1997) Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. *Plant Physiol* **114**: 1561-1566
- McCann MC, Bush M, Milioni D, Sado P, Stacey NJ, Catchpole G, Defernez M, Carpita NC, Hofte H, Ulvskov P, Wilson RH y Roberts K** (2001) Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry* **57**: 811-821
- McCormack E, Braam, J.** (2003) Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis. *New Phytologist* **159**: 585-598
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM y Meagher RB** (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant J* **8**: 613-622
- Meudt WJ** (1987) Investigations on the Mechanism of the Brassinosteroid Response: VI. Effect of Brassinolide on Gravitropism of Bean Hypocotyls. *Plant Physiol* **83**: 195-198
- Migliaccio F y Piconese S** (2001) Spiralizations and tropisms in Arabidopsis roots. *Trends Plant Sci* **6**: 561-565
- Miller RK, Matheos D y Rose MD** (1999) The cortical localization of the microtubule orientation protein, Kar9p, is dependent upon actin and proteins required for polarization. *J Cell Biol* **144**: 963-975
- Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI y Treisman R** (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**: 329-342
- Miralles F y Visa N** (2006) Actin in transcription and transcription regulation. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 261-266
- Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K y Ohme-Takagi M** (2005) The NAC transcription factors NST1 and NST2 of Arabidopsis regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell* **17**: 2993-3006
- Mittler RyL, E.** (1996) Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends Microbiol.* **4**: 10-15
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K y Shinozaki K** (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 765-769
- Morelli G y Ruberti I** (2002) Light and shade in the photocontrol of Arabidopsis growth. *Trends Plant Sci* **7**: 399-404
- Morita MT y Tasaka M** (2004) Gravity sensing and signaling. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 712-718

- Motose H, Sugiyama M y Fukuda H** (2004) A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* **429**: 873-878
- Mouchel CF, Briggs GC y Hardtke CS** (2004) Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes Dev* **18**: 700-714
- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E y Smith FW** (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J* **31**: 341-353
- Mukatira UT, Liu C, Varadarajan DK y Raghothama KG** (2001) Negative regulation of phosphate starvation-induced genes. *Plant Physiol* **127**: 1854-1862
- Mullen JL, Turk E, Johnson K, Wolverton C, Ishikawa H, Simmons C, Soll D y Evans ML** (1998) Root-growth behavior of the *Arabidopsis* mutant rgr1. Roles of gravitropism and circumnutation in the waving/coiling phenomenon. *Plant Physiol* **118**: 1139-1145
- Mullen JL, Wolverton C, Ishikawa H, Hangarter RP y Evans ML** (2002) Spatial separation of light perception and growth response in maize root phototropism. *Plant Cell Environ* **25**: 1191-1196
- Muller A, Guan C, Galweiler L, Tanzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E y Palme K** (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *Embo J* **17**: 6903-6911
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273
- Müssig C, Biesgen, C., Lisso, J., Uwer, U., Weiler, EW., Altmann, T.** (2000) A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between brassinosteroid-action and jasmonic-acid synthesis. *Journal of Plant Physiology* **157**: 143–152
- Müssig C, Fischer S y Altmann T** (2002) Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol* **129**: 1241-1251
- Müssig C, Lisso J, Coll-Garcia D y Altmann T** (2006) Molecular analysis of brassinosteroid action. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 291-296
- Müssig C, Shin GH y Altmann T** (2003) Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**: 1261-1271
- Nagai N, Kitauchi F, Okamoto K, Kanda T, Shimosaka M y Okazaki M** (1994) A transient increase of phenylalanine ammonia-lyase transcript in kinetin-treated tobacco callus. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 558-559
- Nakajima K, Furutani I, Tachimoto H, Matsubara H y Hashimoto T** (2004) SPIRAL1 encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **16**: 1178-1190
- Nakamoto D, Ikeura A, Asami T y Yamamoto KT** (2006) Inhibition of brassinosteroid biosynthesis by either a dwarf4 mutation or a brassinosteroid biosynthesis inhibitor rescues defects in tropic responses of hypocotyls in the *arabidopsis* mutant nonphototropic hypocotyl 4. *Plant Physiol* **141**: 456-464
- Nakamura A, Goda H, Shimada Y y Yoshida S** (2004) Brassinosteroid selectively regulates PIN gene expression in *Arabidopsis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 952-954
- Nakamura A, Higuchi K, Goda H, Fujiwara MT, Sawa S, Koshiba T, Shimada Y y Yoshida S** (2003) Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic

- auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiol* **133**: 1843-1853
- Nam KH y Li J** (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 203-212
- Narang RA, Bruene A y Altmann T** (2000) Analysis of phosphate acquisition efficiency in different Arabidopsis accessions. *Plant Physiol* **124**: 1786-1799
- Neumann G y Martinoia E** (2002) Cluster roots--an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci* **7**: 162-167
- Neumann G, Massomeau, A., Langlade, N., Dinkelaker, B., Hengeler, C., Romheld, V., Martinola, E.** (2000) Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Ann. Bot.* **85**: 909-919
- Nielsen KL, Lynch JP y Weiss HN** (1997) Fractal geometry of bean root systems: correlations between spatial and fractal dimension. *Am J Bot* **84**: 26-33
- Nielsen KL, Lynch, J., Jabllokow, A.G., Curtis, P.S.** (1994) Carbon cost of root systems: an architectural approach. *Plant Soil* **165**: 161-161 169
- Nieminen KM, Kauppinen L y Helariutta Y** (2004) A weed for wood? Arabidopsis as a genetic model for xylem development. *Plant Physiol* **135**: 653-659
- Niklas** (1997) *The Evolutionary Biology of Plants*. The University of Chicago Press
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S y Ueguchi C** (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1365-1377
- Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K y Kawaguchi M** (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* **420**: 426-429
- Oh S, Kwak, JM., Kwun, IC., Nam, HG.** (1996) Rapid and transient induction of calmodulin-encoding gene (s) of *Brassica napus* by a touch stimulus. *Plant Cell Report* **15**: 586-590
- Oh S, Park S y Han KH** (2003) Transcriptional regulation of secondary growth in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **54**: 2709-2722
- Okada K, Shimura, Y.** (1992) Mutational analysis of root gravitropism and phototropism of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Aust J Plant Physiol* **19**: 439-448
- Okada K. y Shimura Y** (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* **50**: 274-276
- Olsen** (1984) Ultrastructure and movements of cell organelles in the root cap of agravitropic mutants and normal seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **60**: 523-531
- Oufattole M, Arango M y Boutry M** (2000) Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of a plasma-membrane H(+)-ATPase, and one of which is induced by mechanical stress. *Planta* **210**: 715-722
- Oyama T, Shimura Y y Okada K** (1997) The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev* **11**: 2983-2995
- Paux E, Carocha V, Marques C, Mendes de Sousa A, Borralho N, Sivadon P y Grima-Pettenati J** (2005) Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. *New Phytol* **167**: 89-100

- Paux E, Tamasloukht M, Ladouce N, Sivadon P y Grima-Pettenati J** (2004) Identification of genes preferentially expressed during wood formation in Eucalyptus. *Plant Mol Biol* **55**: 263-280
- Pavy N, Laroche J, Bousquet J y Mackay J** (2005) Large-scale statistical analysis of secondary xylem ESTs in pine. *Plant Mol Biol* **57**: 203-224
- Perera IY, Heilmann I y Boss WF** (1999) Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5838-5843
- Perera IY, Heilmann I, Chang SC, Boss WF y Kaufman PB** (2001) A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in gravitropic signaling and the retention of cold-perceived gravistimulation of oat shoot pulvini. *Plant Physiol* **125**: 1499-1507
- Perera IY y Zielinski RE** (1992) Structure and expression of the Arabidopsis CaM-3 calmodulin gene. *Plant Mol Biol* **19**: 649-664
- Perotto S y Bonfante P** (1997) Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends Microbiol* **5**: 496-501
- Pierret, Kirby y Moran** (2003) Simultaneous X-ray imaging of plant root growth and water uptake in thin-slab systems. *Plant And Soil* **255**: 361-373
- Plieth C y Trewavas AJ** (2002) Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. *Plant Physiol* **129**: 786-796
- Poke FS, Vaillancourt RE, Potts BM y Reid JB** (2005) Genomic research in Eucalyptus. *Genetica* **125**: 79-101
- Posern G, Miralles F, Guettler S y Treisman R** (2004) Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *Embo J* **23**: 3973-3983
- Prassinis C, Ko JH, Yang J y Han KH** (2005) Transcriptome profiling of vertical stem segments provides insights into the genetic regulation of secondary growth in hybrid aspen trees. *Plant Cell Physiol* **46**: 1213-1225
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y y Boerjan W** (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiol* **133**: 1051-1071
- Rashotte AM, Brady SR, Reed RC, Ante SJ y Muday GK** (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of Arabidopsis. *Plant Physiol* **122**: 481-490
- Reed RC, Brady SR y Muday GK** (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **118**: 1369-1378
- Ringli C, Baumberger N, Diet A, Frey B y Keller B** (2002) ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**: 1464-1472
- Rohde A, Morreel K, Ralph J, Goeminne G, Hostyn V, De Rycke R, Kushnir S, Van Doorselaere J, Joseleau JP, Vuylsteke M, Van Driessche G, Van Beeumen J, Messens E y Boerjan W** (2004) Molecular phenotyping of the pal1 and pal2 mutants of Arabidopsis thaliana reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell* **16**: 2749-2771
- Rose JK, Braam J, Fry SC y Nishitani K** (2002) The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol* **43**: 1421-1435

- Royo J, Nass N, Matton DP, Okamoto S, Clarke AE y Newbigin E** (1996) A retrotransposon-like sequence linked to the S-locus of *Nicotiana glauca* is expressed in styles in response to touch. *Mol Gen Genet* **250**: 180-188
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A y Paz-Ares J** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* **15**: 2122-2133
- Rundel PW, Nobel, P.S.** (1991) Structure and function in desert root systems. special publication No. 10 of the British Ecological Society. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Runge-Metzger** (1995) Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global security. John Wiley & Sons, New York
- Ruppel NJ, Hangarter RP y Kiss JZ** (2001) Red-light-induced positive phototropism in *Arabidopsis* roots. *Planta* **212**: 424-430
- Rutherford R, Gallois P y Masson PH** (1998) Mutations in *Arabidopsis thaliana* genes involved in the tryptophan biosynthesis pathway affect root waving on tilted agar surfaces. *Plant J* **16**: 145-154
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY y Hunt MD** (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P y Scheres B** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**: 463-472
- Sack FD** (1997) Plastids and gravitropic sensing. *Planta* **203**: S63-68
- Sack FD y Leopold AC** (1985) Cytoplasmic streaming affects gravity-induced amyloplast sedimentation in maize coleoptiles. *Planta* **164**: 56-62
- Sack FD, Suyemoto MM y Leopold AC** (1984) Kinetics of amyloplast sedimentation in gravistimulated maize coleoptiles. *Planta* **161**: 459-464
- Sack FD, Suyemoto MM y Leopold AC** (1985) Amyloplast sedimentation kinetics in gravistimulated maize roots. *Planta* **165**: 295-300
- Sakai T, Wada T, Ishiguro S y Okada K** (2000) RPT2. A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 225-236
- Salisbury FJ, Hall A, Grierson CS y Halliday KJ** (2007) Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant J* **50**: 429-438
- Sambrook J. FEFyMT** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, NY
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Ed 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- Sanguineti, Duvick, Smith, Landi y Tuberosa** (2006) Effects of long-term selection on seedling traits and ABA accumulation in commercial maize hybrids. *Maydica* **51**: 329-338
- Santner AA y Watson JC** (2006) The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in *Arabidopsis*. *Plant J* **45**: 752-764
- Scarpella E, Simons EJ y Meijer AH** (2005) Multiple regulatory elements contribute to the vascular-specific expression of the rice HD-Zip gene *Oshox1* in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **46**: 1400-1410
- Scott AC y Allen NS** (1999) Changes in cytosolic pH within *Arabidopsis* root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. *Plant Physiol* **121**: 1291-1298
- Scheres B** (1997) Cell signaling in root development. *Curr Opin Genet Dev* **7**: 501-506
- Schiefelbein JW y Benfey PN** (1991) The development of plant roots: new approaches to underground problems. *Plant Cell* **3**: 1147-1154

- Schmele IyK, H.** (1990) Enhanced activity of the plasma membrane localized callose synthase in cucumber leaves with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **37**: 221–228
- Schmidt W, Tittel J y Schikora A** (2000) Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in Arabidopsis roots. *Plant Physiol* **122**: 1109-1118
- Schultze M y Kondorosi A** (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* **32**: 33-57
- Schumacher K y Chory J** (2000) Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 79-84
- Sedbrook J, Boonsirichai K, Chen R, Hilson P, Pearlman R, Rosen E, Rutherford R, Batiza A, Carroll K, Schulz T y Masson PH** (1998) Molecular genetics of root gravitropism and waving in Arabidopsis thaliana. *Gravit Space Biol Bull* **11**: 71-78
- Sedbrook JC, Chen R y Masson PH** (1999) ARG1 (altered response to gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1140-1145
- Seo HS, Yang JY, Ishikawa M, Bolle C, Ballesteros ML y Chua NH** (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* **423**: 995-999
- Sharpley A** (1999) Agricultural phosphorus, water quality, and poultry production: are they compatible? *Poult Sci* **78**: 660-673
- Shirsat A, Bell, A., Spence, J., Harris, JN.** (1996) The Brassica napus extA extensin gene is expressed in regions of the plant subject to tensile stresses. *Planta* **199**: 618–624
- Shoji T, Narita NN, Hayashi K, Asada J, Hamada T, Sonobe S, Nakajima K y Hashimoto T** (2004) Plant-specific microtubule-associated protein SPIRAL2 is required for anisotropic growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* **136**: 3933-3944
- Signora L, De Smet I, Foyer CH y Zhang H** (2001) ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in Arabidopsis. *Plant J* **28**: 655-662
- Sistrunk ML, Antosiewicz DM, Purugganan MM y Braam J** (1994) Arabidopsis TCH3 encodes a novel Ca<sup>2+</sup> binding protein and shows environmentally induced and tissue-specific regulation. *Plant Cell* **6**: 1553-1565
- Skoog F y Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* **54**: 118-130
- Sorin C, Bussell JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, McKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G y Bellini C** (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. *Plant Cell* **17**: 1343-1359
- Sorin C, Negroni L, Balliau T, Corti H, Jacquemot MP, Davanture M, Sandberg G, Zivy M y Bellini C** (2006) Proteomic analysis of different mutant genotypes of Arabidopsis led to the identification of 11 proteins correlating with adventitious root development. *Plant Physiol* **140**: 349-364
- Staves MP, Wayne R y Leopold AC** (1997) Cytochalasin D does not inhibit gravitropism in roots. *Am J Bot* **84**: 1530-1535
- Sterky F, Bhalerao RR, Unneberg P, Segerman B, Nilsson P, Brunner AM, Charbonnel-Campaa L, Lindvall JJ, Tandré K, Strauss SH, Sundberg B, Gustafsson P, Uhlen M, Bhalerao RP, Nilsson O, Sandberg G, Karlsson J, Lundeberg J y Jansson S** (2004) A Populus EST resource for plant functional genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13951-13956



- Sterky F, Regan S, Karlsson J, Hertzberg M, Rohde A, Holmberg A, Amini B, Bhalerao R, Larsson M, Villarreal R, Van Montagu M, Sandberg G, Olsson O, Teeri TT, Boerjan W, Gustafsson P, Uhlen M, Sundberg B y Lundeberg J** (1998) Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5,692 expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13330-13335
- Sticher L, Mauch-Mani B y Metraux JP** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **35**: 235-270
- Strack D, Fester T, Hause B, Schliemann W y Walter MH** (2003) Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *J Chem Ecol* **29**: 1955-1979
- Stumm DyG, C.** (1986) Role of papillae in the induced systemic resistance of cucumbers against *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **29**: 405-410
- Szekeres M, Nemeth K, Koncz-Kalman Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Redei GP, Nagy F, Schell J y Koncz C** (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**: 171-182
- Szymanski DB** (2005) Breaking the WAVE complex: the point of *Arabidopsis* trichomes. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 103-112
- Takahashi H** (1997) Hydrotropism: the current state of our knowledge. *J Plant Res* **110**: 163-169
- Takahashi H y Scott TK** (1991) Hydrotropism and its interaction with gravitropism in maize roots. *Plant Physiol* **96**: 558-564
- Takahashi H, Takano M, Fujii N, Yamashita M y Suge H** (1996) Induction of hydrotropism in clinorotated seedling roots of Alaska pea, *Pisum sativum* L. *J Plant Res* **109**: 335-337
- Tasaka M, Kato T y Fukaki H** (1999) The endodermis and shoot gravitropism. *Trends Plant Sci* **4**: 103-107
- Tatsuki M y Mori H** (1999) Rapid and transient expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isogenes by touch and wound stimuli in tomato. *Plant Cell Physiol* **40**: 709-715
- Taylor NG, Scheible WR, Cutler S, Somerville CR y Turner SR** (1999) The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *Plant Cell* **11**: 769-780
- Thitamadee S, Tuchiara K y Hashimoto T** (2002) Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* **417**: 193-196
- Thompson MV y Holbrook NM** (2004) Root-gel interactions and the root waving behavior of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**: 1822-1837
- Ticconi CA, Delatorre CA, Lahner B, Salt DE y Abel S** (2004) *Arabidopsis* pdr2 reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J* **37**: 801-814
- Timonen y Peterson** (2002) Cytoskeleton in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* **244**: 199-210
- Tsugeki R, Olson ML y Fedoroff NV** (1998) Transposon tagging and the study of root development in *Arabidopsis*. *Gravit Space Biol Bull* **11**: 79-87
- Turner SR y Somerville CR** (1997) Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *Plant Cell* **9**: 689-701

- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G y Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963-1971
- Utsuno K, Shikanai T, Yamada Y y Hashimoto T** (1998) Agr, an Agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane-protein family member. *Plant Cell Physiol* **39**: 1111-1118
- Van As H** (2007) Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport. *J Exp Bot* **58**: 743-756
- van Wees SC, Luijendijk M, Smoorenburg I, van Loon LC y Pieterse CM** (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol Biol* **41**: 537-549
- Vance CP** (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol* **127**: 390-397
- Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F y Chory J** (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 177-201
- Vitha S, Zhao L y Sack FD** (2000) Interaction of root gravitropism and phototropism in *Arabidopsis* wild-type and starchless mutants. *Plant Physiol* **122**: 453-462
- von Arnim AG, Osterlund MT, Kwok SF y Deng XW** (1997) Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **114**: 779-788
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T y Chory J** (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* **2**: 505-513
- Weise SE y Kiss JZ** (1999) Gravitropism of inflorescence stems in starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Int J Plant Sci* **160**: 521-527
- Whetten R, Sun YH, Zhang Y y Sederoff R** (2001) Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. *Plant Mol Biol* **47**: 275-291
- Whippo CW y Hangarter RP** (2005) A brassinosteroid-hypersensitive mutant of BAK1 indicates that a convergence of photomorphogenic and hormonal signaling modulates phototropism. *Plant Physiol* **139**: 448-457
- Williamson LC, Ribrioux SP, Fitter AH y Leyser HM** (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 875-882
- Wisniewska J, Xu J, Seifertova D, Brewer PB, Ruzicka K, Blilou I, Rouquie D, Benkova E, Scheres B y Friml J** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**: 883
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ y Graham MW** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478
- Wright AJ, Knight H y Knight MR** (2002) Mechanically stimulated TCH3 gene expression in *Arabidopsis* involves protein phosphorylation and EIN6 downstream of calcium. *Plant Physiol* **128**: 1402-1409
- Xu J y Scheres B** (2005) Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity. *Plant Cell* **17**: 525-536

- Xu W, Purugganan MM, Polisensky DH, Antosiewicz DM, Fry SC y Braam J** (1995) Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**: 1555-1567
- Yang HS, Kim DJ y Kim HJ** (2003) Rice straw-wood particle composite for sound absorbing wooden construction materials. *Bioresour Technol* **86**: 117-121
- Yang J, Lin R, Sullivan J, Hoecker U, Liu B, Xu L, Deng XW y Wang H** (2005) Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 804-821
- Yang J, Park S, Kamdem DP, Keathley DE, Retzel E, Paule C, Kapur V y Han KH** (2003) Novel gene expression profiles define the metabolic and physiological processes characteristic of wood and its extractive formation in a hardwood tree species, *Robinia pseudoacacia*. *Plant Mol Biol* **52**: 935-956
- Yang Q, Li M, Wang B, Li R y Wang C** (2003) [Dynamics of biomass and net primary productivity in succession of south subtropical forests in southwest Guangdong]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* **14**: 2136-2140
- Yanofsky MF y Nester EW** (1986) Molecular characterization of a host-range-determining locus from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **168**: 244-250
- Ye ZH** (2002) Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 183-202
- Ye ZH, Freshour G, Hahn MG, Burk DH y Zhong R** (2002) Vascular development in Arabidopsis. *Int Rev Cytol* **220**: 225-256
- Yi C y Deng XW** (2005) COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biol* **15**: 618-625
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T y Chory J** (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**: 181-191
- Yue B, Xue W, Xiong L, Yu X, Luo L, Cui K, Jin D, Xing Y y Zhang Q** (2006) Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. *Genetics* **172**: 1213-1228
- Yuen CY, Pearlman RS, Silo-Suh L, Hilson P, Carroll KL y Masson PH** (2003) WVD2 and WDL1 modulate helical organ growth and anisotropic cell expansion in Arabidopsis. *Plant Physiol* **131**: 493-506
- Zhang H y Forde BG** (1998) An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**: 407-409
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW y Forde BG** (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6529-6534
- Zhang T, Yuan Y, Yu J, Guo W y Kohel RJ** (2003) Molecular tagging of a major QTL for fiber strength in Upland cotton and its marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* **106**: 262-268
- Zhao C, Johnson BJ, Kositsup B y Beers EP** (2000) Exploiting secondary growth in Arabidopsis. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiol* **123**: 1185-1196
- Zhong R, Demura T y Ye ZH** (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 3158-3170
- Zhong R, Ripberger A y Ye ZH** (2000) Ectopic deposition of lignin in the pith of stems of two Arabidopsis mutants. *Plant Physiol* **123**: 59-70
- Zhou A, Wang H, Walker JC y Li J** (2004) BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant J* **40**: 399-409



## CURRICULUM VITAE

### MÓNICA LANZA LUCIO

---

#### FORMACIÓN ACADÉMICA

- 1996-2001 Licenciada en **Biología** con la Especialidad **Biotecnología**, por la Universidad Complutense de Madrid.
- 2002-2003 Cursos teóricos de doctorado del programa de **Biología Vegetal: Aspectos moleculares, fisiológicos y biotecnológicos de la Universidad Autónoma de Madrid**.
- Mayo 2003 Curso **“Histoquímica Vegetal”** -CSIC
- Octubre 2004 Obtención del **Diploma de Estudios Avanzados (DEA)** en la Universidad Autónoma de Madrid con la exposición del trabajo experimental **“Identificación y caracterización de genes que controlan el desarrollo de la arquitectura radicular en *Arabidopsis thaliana*”**.

#### EXPERIENCIA LABORAL

- Julio 2002- Junio 2006 **Beca del programa de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia**. Desarrollo experimental del proyecto BIO2001-1204 **“Identificación y caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* alterados en la disposición de las raíces laterales”**, dirigida por Antonio Leyva Tejada en el Centro Nacional de Biotecnología - CSIC.
- Julio- Noviembre 2006 **Titulado Superior de Investigación y laboratorio (G.P.1)** dentro del proyecto **“Mecanismos moleculares implicados en vascularización primaria y secundaria como moduladores de la disposición funcional de raíces (Arquitectura Radicular)”** desarrollado en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC.
- Diciembre 2006- Noviembre 2007 **Titulado Superior de Investigación y laboratorio (G.P.1)** dentro del proyecto **“Caracterización genética y molecular de la ruta de señalización de la respuesta a arseniato en *Arabidopsis thaliana*”** desarrollado en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC.

#### COMUNICACIONES ESCRITAS A CONGRESOS

- 2004 **Mónica Lanza**, Berenice García Ponce de León, M<sup>a</sup> Dolores Segura, Yolanda Leo del Puerto, Javier Paz-Ares y Antonio Leyva **“Identificación de mutantes de *Arabidopsis thaliana* alterados en arquitectura radicular”** –VII Reunión de Biología Molecular de Plantas -Málaga- España. 3-5 junio de 2004. Comunicación II-P-23.
- 2006 **Mónica Lanza**, Berenice García, Ana Páez, Yolanda Leo, Javier Paz-Ares y Antonio Leyva **“La actina2 media los mecanismos de sorteo de obstáculos en *Arabidopsis thaliana*”**- VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas- Pamplona- España. 28 Junio- 1 julio de 2006. Comunicación 8-P-15.
- 2007 García Ponce Berenice, **Lanza Mónica**, Alvarez-Buylla Elena y Leyva Antonio. **“Participation of auxin and brassinosteroid during the tigmotropic response”**- 19<sup>TH</sup> Annual Meeting International Plant Growth Substances Association.- Puerto Vallarta-México.

- 2007 Catarecha P., Segura M<sup>a</sup>.D., Franco- Zorrilla J.M., Garcia-Ponce B., **Lanza M.**, Leo Y., Paz-Ares J. and Leyva A. “Arsenate and phosphate interacting signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*”- Plant Genomics European Meetings- Tenerife-España. 3-6 de octubre de 2007. Comunicación P7.37.
- 2008 Pablo Catarecha, Gabriel Castrillo, **Mónica Lanza**, Ana Páez, Yolanda Leo, Javier Paz-Ares y Antonio Leyva. “Arsenic transport studies using mutants” - 20th New Phytologist Symposium. Arsenic: Unravelling its metabolism and speciation in plants. - Aberdeen, Escocia, Reino Unido. 26-27 de junio de 2008. Comunicación 3.2.
- 2008 Pablo Catarecha, Gabriel Castrillo, **Mónica Lanza**, Ana Páez, Yolanda Leo, Javier Paz-Ares y Antonio Leyva. “Análisis de la respuesta a arseniato en *Arabidopsis thaliana*” - IX Reunión de Biología Molecular de Plantas. - Santiago de Compostela, La Coruña, España. 1-4 de julio de 2008. Comunicación P31.
- 2008 Pablo Catarecha, Gabriel Castrillo, **Mónica Lanza**, Ana Páez, Yolanda Leo, Javier Paz-Ares y Antonio Leyva. “Analysis of arsenate response in *Arabidopsis thaliana*” 19th - International Conference on Arabidopsis research. - Montreal, Quebec, Canadá, 23-27 de julio de 2008. En preparación.

## PUBLICACIONES

- Catarecha P., Segura M<sup>a</sup>.D., Franco- Zorrilla J.M., Garcia-Ponce B., **Lanza M.**, Leo Y., Solano R., Paz-Ares J. and Leyva A.- “A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation”. Plant Cell, 2007 Mar; 19(3): 1123-33.